



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Proposal for molecular tools for the  
epidemiology of Contagious Bovine Pleuro Pneumonia and  
classification of unknown *Mycoplasma* sp. isolated from *Struthio*  
*camelus*.

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Stefan Langer
Matrikel-Nummer:	0203013
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Genetik – Mikrobiologie
Betreuerin / Betreuer:	Doz. Dipl.-Biol. Dr. Hans-Jürgen Busse

Wien, am 18.02.2009

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)

<b>1</b>	<b>Einleitung:</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Mykoplasmen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Allgemeine Eigenschaften	1
1.1.3	Vorkommen, Erregerbiologie und Pathologie	3
1.1.4	Allgemeine Differenzierung	4
1.1.5	<i>Mycoplasma</i> sp. isoliert aus <i>Struthio camelus</i>	4
1.1.5.1	Herkunft	4
1.1.6	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> small colony type	4
1.1.6.1	Herkunft/Bedeutung/Probleme	4
<b>1.2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>7</b>
1.2.1	Genetische Heterogenität in <i>MmmSC</i>	7
1.2.2	Artbeschreibung	7
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>8</b>
<b>2.1</b>	<b>Mykoplasmenstämme</b>	<b>8</b>
2.1.1	Isolate der taxonomisch einzuordnenden Stämme und Referenzstämme:	8
2.1.2	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC Stämme ( <i>MmmSC</i> )	9
<b>2.2</b>	<b>Kultivierung der Mykoplasmen</b>	<b>10</b>
2.2.1	Anzucht der Isolate:	10
2.2.2	Biomasse für die Stammsammlung:	10
2.2.2.1	Modifiziertes Hayflick Medium(MedB)	11
2.2.3	Anzucht von <i>MmmSC</i>	12
2.2.3.1	Frey Medium (nach European Pharmacopoeia 5.6.):	12
2.2.4	DNA Extraktion	13
2.2.4.1	Extraktion v. DNA der <i>MmmSC</i> Stämme unter Verw. d. PrestoSpin D Bug Kit :	13
2.2.4.2	Extraktion der DNA mit der Freeze-Thaw Methode	13
2.2.4.3	DNA Fällung:	14
2.2.4.4	Extraktion der DNA von <i>M.struthionis</i> sp. nov./ <i>M.nasistruthionis</i> sp. nov. DNA	14
2.2.4.5	Extraktion von DNA für DNA-DNA Hybridisierung und G+C-% Analyse	15
2.2.5	DNA Konzentrationsbestimmung	16
2.2.5.1	Photometrisch	16
2.2.5.2	Chemische DNA Bestimmung	17
2.2.6	PCR basierende Methoden	18
2.2.6.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.2.6.1.1	Materialien für PCR	18
2.2.6.1.2	Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte	18
2.2.6.1.3	PCR-Primer	19
2.2.6.1.4	Amplifizierung der 16S rRNA kodierenden Gene (16S rDNA PCR):	21
2.2.6.1.5	ITS-PCR / ARDRA der ITS	22
2.2.6.1.6	RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA)	24
2.2.6.1.7	PCR mit spezifischen Primern	25
2.2.6.1.8	DGGE (Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese)	26
2.2.6.2	Klonierung und Sequenzierung	27
2.2.6.2.1	Elution	27
2.2.6.2.2	Klonieren	28
2.2.6.2.3	Plasmid Miniprep.	30
2.2.6.3	Primer Design	31
2.2.6.4	GC mol% Gehalt	31
2.2.6.4.1	Probenaufbereitung für GCmol% Gehalt Bestimmung:	31
2.2.6.5	DNA-DNA Hybridisierung	32
2.2.6.5.1	DNA Markierung	32
2.2.6.5.2	Bewertung der Markierung	32
2.2.6.5.3	DNA-DNA Hybridisierung	33

2.2.6.5.4	Berechnung der Hybridisierung	35
2.2.7	Gewinnung von Hyperimmunseren	35
2.2.7.1	Ganzzellpräparation	35
2.2.7.2	Immunisierung der Kaninchen	35
2.2.7.3	Gewinnung des Hyperimmunserums	36
2.2.8	Protein und Antigenprofile	36
2.2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.8.1.1	Vorbereitung der SDS-PAGE	36
2.2.8.1.2	SDS-PAGE	37
2.2.8.1.3	Coomassieblau Färbung	38
2.2.8.2	Westernblot	38
2.2.8.2.1	Proteintransfer	39
2.2.8.2.2	Detektion mit Serumantikörpern	39
2.2.8.2.3	Kolonieimmunoblot	40
2.2.8.2.4	Wachstumshemmung in der Anwesenheit von Serum	40
2.2.9	Chemotaxonomische Methoden	41
2.2.9.1	Polare Lipid-Analyse mittels 2D-Dünnschicht Chromatographie (2D-TLC)	41
2.2.9.1.1	Biomasseanzucht für Extraktion polarer Lipide:	41
2.2.9.1.2	Extraktion der Polaren Lipide	41
2.2.9.1.3	Analyse des Lipidmusters	41
2.2.9.2	Koloniemorphologie	43
2.2.9.3	Zellmorphologische Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)	43
2.2.9.3.1	Proben Präparation	43
2.2.9.4	Filtrierbarkeit	45
2.2.10	Physiologische Charakterisierung	45
2.2.10.1	Resistenz gegenüber Penicillin	45
2.2.10.2	Temperaturleranz	45
2.2.10.3	Anaerobes Wachstum bei 37°C	46
2.2.10.4	Untersuchung auf Cholesterolbedarf	46
2.2.10.4.1	Wachstum auf serumfreien Nährböden, Untersuchung des Cholesterolbedarfs	46
2.2.10.4.2	Verhalten gegenüber Digitonin	48
2.2.10.5	Verwertung von Kohlenhydraten und Alkoholen	49
2.2.10.6	Hydrolyse von Arginin	49
2.2.10.7	Hydrolyse von Harnstoff	49
2.2.10.8	Reduktion von Methylenblau	49
2.2.10.9	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit-Reduktion.	50
2.2.10.10	Phosphataseaktivität	51
2.2.10.11	Hydrolyse von Gelatine	51
2.2.10.12	Hydrolyse von Casein	52
2.2.10.13	Film/Fleckenbildung	53
2.2.10.14	Haemadsorption	53
2.2.10.15	Hämolyse	54
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung der genomischen Variabilität in <i>MmmSC</i></b>	<b>55</b>
3.1.1	RAPD-PCR – „Fingerprinting“	55
3.1.1.1	Spezifische Bande 133/2: Mara 1	58
3.1.1.2	spezifische Bande 232/2: Asmara1	60
3.1.1.3	Weitere eluierte spezifische Banden und daraus konstruierte Primer	60
3.1.2	DGGE	61
3.1.3	Untersuchungen der Stämme beruhend auf Publikationen	62
3.1.3.1	Nachweis des „housekeeping gens“ <i>FusA</i> im <i>Mycoplasma mycoides</i> Cluster	62
3.1.3.2	Spezifische Bande für Stamm PG1 <sup>T</sup>	63
3.1.3.3	Unterscheidung der Stämme von <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC mit Hilfe von various number tandem repeats (VNTR)	64
<b>3.2</b>	<b>Beschreibung der neuen Arten <i>Mycoplasma struthionis</i> sp.nov. und <i>Mycoplasma nasistruthionis</i> sp.nov.</b>	<b>67</b>

3.2.1	Beschreibung von <i>Mycoplasma struthionis</i> sp. nov.	67
3.2.2	Beschreibung von <i>Mycoplasma nasistruthionis</i> sp. nov.	67
<b>4</b>	<b><i>Literaturverzeichnis:</i></b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b><i>Anhang</i></b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Resümee der Untersuchungen bezüglich der genomischen Heterogenität von <i>MmmSC</i></b>	<b>77</b>
<b>5.2</b>	<b><i>Mycoplasma struthionis</i> sp. nov and <i>Mycoplasma nasistruthionis</i> sp. nov. from Ostrich (<i>Struthio camelus</i>) with respiratory tract disease</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b><i>Curriculum vitae</i></b>	<b>97</b>



# **1 Einleitung:**

## **1.1 Mykoplasmen**

### **1.1.1 Taxonomie**

Mykoplasmen zählen durch ihr kleines Genom (577 bis 1380 kBp) und ihrer geringen Größe (0,2-0,8µm) zu den einfachsten und kleinsten Prokaryoten. Die ungefähr 200 verschiedenen Spezies sind taxonomisch folgenderweise eingeordnet:

Abteilung: *Tenericutes* (Razin, 1998)

Klasse: *Mollicutes* (Tully et al., 1993)

Ordnung: *Mycoplasmatales* (Tully et al., 1993)

Familie: *Mycoplasmataceae* (Freundt, 1955)

Gattung: *Mycoplasma* (Tully et al., 1993; Razin, 1998)

Die Klasse *Mollicutes* beinhaltet folgende acht Gattungen: *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Entomoplasma* und *Ureaplasma* (Tully et al. 1993). Eine phylogenetische Verwandtschaft zu Clostridien lässt sich auf Basis von 16S rDNA Analysen erkennen (Bredt 1988). Daher werden sie oft zur Gruppe der gram-positive Bakterien mit niedrigem G-C Gehalt gerechnet.

### **1.1.2 Allgemeine Eigenschaften**

Mykoplasmen zeichnen sich durch ein sehr kleines Genom aus (577 bis 1380kBp), welches einen niedrigen G-C Gehalt (23-40mol%) aufweist (Bove, 1993; Razin, 1985 & Razin et al. 1998; Tully et al., 1993). Dies kann auf die parasitäre Lebensweise und die damit verbundene Reduktion verschiedener Zellfunktionen bzw. Synthesefähigkeiten zurückgeführt werden (Razin, 1992). Vergleichende 16S rRNA Genuntersuchungen weisen darauf hin, dass sich die *Mollicutes* aus der Gruppe der gram-positiven Bakterien mit niedrigen GC mol% Gehalt durch degenerative Entwicklung abgespalten haben (Razin, 1992a; Woese et al., 1987).

Das Fehlen einer Peptidoglykanschicht und der dafür kodierenden Gene, trägt ebenfalls zur Reduktion des Genoms bei. Die daraus resultierende Plastizität ist auch die Erklärung, warum Mykoplasmen Filter durchdringen können, welche eine Porengröße von nur 0,22µm besitzen (Kayser et al., 1998). Die Tendenz konisch in Nährböden zu wachsen und die dadurch entstehenden charakteristischen spiegeleiförmigen Kolonien, die geringe osmotische Stabilität und die Resistenz gegen Antibiotika bzw. Hemmstoffe, welche die Peptidoglykansynthese hemmen oder die Zellwand abbauen, ist ebenfalls auf das Fehlen der Peptidoglykanschicht zurückzuführen.

Die Zellmembran besteht zu mehr als zwei Drittel aus Membranproteinen und zu circa einem Drittel aus Lipiden (Phospho-, Glyco- und neutrale Lipide), wohingegen andere Eubakterien nur einen sehr geringen Anteil an Membranproteinen aufweisen. (Razin et al., 1998). Somit gehören die Proteine der Membran zu den häufigsten Antigenen von *Mollicutes*. Diese gehören zu Oberflächenstrukturen, welche hinsichtlich ihrer Expression und Größe variieren (Razin et al. 1998). Weiters adaptieren Mykoplasmen die Lipidzusammensetzung ihrer Membran an unterschiedliche physiologische bzw. umweltbedingte Einflüsse. Dies geschieht durch Veränderung der Acylketten sowie durch die Veränderung der polaren Köpfe membranintegrierter Phospho- und Glycolipide (Andersson et al., 1996).

Je nach Kultivierungsbedingungen können verschiedene Zellformen vorliegen. Die häufigsten Grundformen in Flüssigmedien sind kokkoide oder auch birnenförmige Zellen mit einem Durchmesser von 0.3-0.8µm. Einen Durchmesser von 0.2-0.4µm dafür aber eine Länge von bis zu 150µm erreichen filamentöse Zellformen, welche auch öfters Verzweigungen aufweisen. Diese Wachstumsform war auch namensgebend (griech. mykes- Pilz und plasma – Form). Auf festen Nährböden werden charakteristische Kolonien ausgebildet. Diese erscheinen spiegeleiförmig mit einem Durchmesser von 100-600µm. Das Zentrum der Kolonien erscheint dunkler als die Peripherie, bedingt durch das Einwachsen der Zellen in den Agar (Edward u. Freundt, 1969). Die Kultivierung von Mykoplasmen stellt hohe Ansprüche an die Zusammensetzung der Medien, welche aus Herzextrakt, Hefeextrakt, Serum und weiteren Zusätzen wie Vitaminen, Spurenelementen und Nukleinsäuren bestehen. Da Mykoplasmen nicht oder nur teilweise zur Fettsäuresynthese befähigt sind und Cholesterol zwar brauchen, dieses aber nicht selbst synthetisieren können, muss dieses



ebenfalls beigelegt werden (Razin et al., 1998). Ausserdem werden häufig Wachstumshemmer wie Penicillin (hemmt gram-positive Bakterien) und Thalliumacetat (hemmt Pilze und gram negative Bakterien) dem Medium zugesetzt, um in klinischen Proben zu verhindern, dass neben den Mykoplasmen, welche oft eine lange Inkubationszeit aufweisen, auch eventuell vorhandene zellwandtragende Bakterien oder Pilze anwachsen (Bredt 1988; Dallmann, 1996; Razin, 1992a; Winter, 2004).

### **1.1.3 Vorkommen, Erregerbiologie und Pathologie**

In der Natur kommen Mykoplasmen als Parasiten in Wirbeltieren, Insekten und Pflanzen vor (Razin et al., 1989). Sie besiedeln bei Mensch und Tier bevorzugt die Schleimhäute des Urogenital- sowie Respirationstrakts. Aber auch Augen, Gelenke, Milchdrüsen oder der Verdauungsapparat können befallen werden und zu meist chronischen Krankheitsbildern führen (Razin, 1981; Razin u. Freundt, 1984; Tully et al., 1993). Mykoplasmen können in immunkompetenten Wirten mehrere Wochen bis Monate überleben, indem sie Mechanismen nutzen, die die Immunantwort umgehen oder blockieren (Cassel et al., 1978; Freundt, 1974; Razin et al., 1998). Besonders molekulares Mimikry wird hier als Strategie vermutet. Dies geschieht indem die Mykoplasmen Wirtsantigene an ihrer Oberfläche exprimieren, oder Adsorption als Schutz gegen die Immunabwehr einsetzen (Dallmann, 1996; Borst, 1991; Cassel, 1982). Eine zentrale Rolle bei der Manifestation einer Mykoplasmeninfektion spielen Adhärenzmoleküle, welche einen engen Kontakt zwischen Mykoplasmen und Wirtszellen vermitteln (Dallmann, 1996; Razin u. Jacobs, 1992). Hier können enzymatische Reaktionen zu einer direkten Schädigung der Wirtszellen führen. Dabei handelt es sich um die Aktivität von Proteasen, Nukleasen, Phospholipasen und die Aktivität von Stoffwechselprodukten wie zB. Wasserstoffperoxid (Cassel et al., 1987; Miles, 1992; Razin et al., 1998; Simecka et al., 1992; Tryon u. Baseman, 1992). Weiters weisen Mykoplasmen eine hohe phänotypische Variabilität in der Erregerpopulation auf, welche auf spontanen Veränderungen der Membranproteinsynthese bzw. Deletionen und Insertionen in repetitiven Sequenzen der Oberflächenproteine beruht. Dies kann zu veränderten Antigenen und auch zu einer Änderung der pathogeneserelevanten Eigenschaften führen (Citti et al., 1997)

### **1.1.4 Allgemeine Differenzierung**

In Zukunft werden Sequenzanalysen eine immer wichtigere Rolle spielen, um phylogenetische und taxonomische Aussagen über Mikroorganismen zu treffen. Nach wie vor wird eine Kombination von phylogenetischen Daten (meist handelt es sich dabei um die partielle Sequenzierung des Genoms – hierbei wiederum um die Gensequenz der 16S rRNA) und phänotypischen Merkmalen benutzt, um unbekannte Bakterienisolate zu charakterisieren (Razin et al., 1998). Die phänotypischen Untersuchungen umfassen morphologische, serologische, sowie biochemische Eigenschaften und ermöglichen die Differenzierung von Mykoplasmen.

### **1.1.5 *Mycoplasma* sp. isoliert aus *Struthio camelus***

#### **1.1.5.1 Herkunft**

Die Isolate stammen aus *Struthio camelus* (dem afrikanischen Strauß). Die Probennahme fand bei Tieren statt welche krankhafte Störungen des Respirationstrakts aufwiesen. Auf 5 Farmen in Namibia wurden je zwei Proben genommen.

### **1.1.6 *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type**

#### **1.1.6.1 Herkunft/Bedeutung/Probleme**

*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type (*MmmSC*) ist der Erreger der Lungenseuche bei Rindern (engl. contagious bovine pleuropneumonia- kurz CBPP). Dabei handelt es sich um eine höchst ansteckende Erkrankung, welche von der OIE (World Organisation for Animal Health) als eine Liste A Krankheit geführt wurde. Außer *MmmSC*, dem einzigen bakteriellen Erreger der Liste A, waren 14 meldepflichtige Tierseuchen darin gelistet, allesamt mit dem Potential schneller Ausbreitung und schwerwiegender sowohl ökonomischer als auch gesundheitlicher Folgen (OID, Factsheet).

CBPP ist in der westlichen Welt großteils ausgerottet, doch kommt es immer wieder zu sporadischen Ausbrüchen, welche aber durch strikte Quarantänemaßnahmen rasch unter

Kontrolle gebracht werden können. Neben Teilen Asiens (spez. China, Indien) ist *MmmSC* in Afrika endemisch und stellt dort ein großes Problem dar. Die Verbreitung der Krankheit in Afrika ist durch vier Punkte gekennzeichnet (W.N.Masiga, 1996):

- Rinder sind die einzig betroffenen Tiere;
- es gibt kein Wildtierresservoir;
- chronische Krankheitsträger sind die Hauptinfektionsquelle;
- die weit verbreitete Nomadenwirtschaft spielt eine wichtige Rolle in der Ausbreitung.

Aufgrund der Nomadenwirtschaft und dem Krankheitsverlauf ist es schwierig die Krankheit zu bekämpfen. CPBB wird durch Tröpfcheninfektion direkt übertragen. Ein großes Problem sind die latenten Krankheitsträger, und die Inkubationszeit von drei bis sechs Wochen. Die Krankheit hat eine Mortalitätsrate von bis zu 70% und kann in einer der drei folgenden Formen vorliegen: akute, perakute und milde Form. Die akute Form ist der häufigste Verlauf und endet meist zwei bis fünf Wochen nach den ersten Anzeichen der Krankheit tödlich. Die Temperatur steigt plötzlich, das Tier verliert seinen Appetit, die Milchproduktion sinkt, die Atmung ist flach und schnell. Beim Befall der Lunge kommt es zu großflächigen Entzündungen, sowie zu Flüssigkeitsansammlungen. CBPP ist mit großen Schmerzen für das Tier verbunden. Die weniger oft auftretende perakute Form, zeigt häufig ähnliche Symptome wie die akute Form, endet aber bereits nach ein bis drei Wochen mit dem Tod. Bei der milden Form kommt es meist zu keinem Krankheitsbild, die Tiere sind aber Träger der Krankheit und verbreiten sie. Unter Stress kann es aber zum Übergang von der milden zur akuten Form kommen (W.N.Masiga, 1996; APHIS; OIE).

Wird CBPP diagnostiziert, sind strenge Quarantänevorschriften einzuhalten und die infizierten Tiere zu töten. Die Kadaver werden so entsorgt, dass von ihnen keine weitere Gefahr ausgeht (Blancou, 1996). Leider werden diese Vorschriften in weniger entwickelten Staaten oftmals nicht eingehalten, bzw. werden erkrankte Tiere von den Besitzern, aus Angst die gesamte Herde zu verlieren, nicht gemeldet. Ein veterinärmedizinischer Dienst, der regelmäßige Kontrollen unternehmen könnte, ist oft nicht existent oder in der Lage, die geeigneten Maßnahmen zu ergreifen. Auch

Impfkampagnen in den 1960er, 1970er und 1980er Jahren konnten an dieser Situation nichts ändern. Während in Europa die Krankheit bis auf sporadische Ausbrüche in Spanien und Portugal ausgerottet wurde, ist sie in Afrika wieder endemisch.

Ohne Zweifel handelt es sich bei CBPP um eine der meist bedeutendsten Krankheiten, ausgelöst durch Mykoplasmen. Sie stellt eine Ursache für beträchtliche Schäden in der Viehwirtschaft und damit auch der Volkswirtschaft dar. Die Internationale Atomenergieorganisation (engl.: International Atomic Energy Agency, IAEA) hat daher ein internationales Projekt gestartet, dessen Ziel es ist, CBPP unter Kontrolle zu bekommen. Die daraus entwickelten Techniken und Resultate sollen direkt in den betroffenen Ländern zur Anwendung kommen. Nicht nur die Krankheit soll bekämpft werden und die damit verbundenen wirtschaftlichen Schäden, sondern auch ein Wissenstransfer in die betroffenen Länder gewährleistet werden.

Die vorliegende Arbeit ist Teil dieses internationalen Projekts, wobei die Aufgabe in der Untersuchung der genomischen Variabilität verschiedener *MmmSC* Stämme bestand.

## **1.2 Problemstellung**

### **1.2.1 Genetische Heterogenität in *MmmSC***

Aufgrund der ökonomischen Schäden, die durch die Krankheit ausgelöst werden, ist es dringend notwendig eine schnelle Identifikation der Stämme zu ermöglichen. Dadurch kann die Krankheit leichter zu ihrem Ursprung verfolgt und unter Kontrolle gebracht werden.

Die genetische Variabilität in *MmmSC* Stämmen sollte mit Hilfe RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) und daraus resultierenden „Fingerprints“ untersucht werden. Es galt zu zeigen, ob man *MmmSC* Stämme mit Hilfe dieser Methode voneinander unterscheiden kann, wie es bereits für andere untereinander nah verwandte Bakterienstämme gezeigt wurde (Welsh and McClelland, 1990). Basierend auf Unterschieden in den genomischen Fingerabdrücken sollten dann spezifische PCR-Ansätze entwickelt werden. Weiters wurden gleich große PCR-Fragmente mit Hilfe der degenerierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) auf Sequenzunterschiede untersucht. Die Sequenzen der auf dieser Weise gefundenen stammspezifischen PCR Produkte, sollten dann zur Konstruktion von spezifischen Primern herangezogen werden. Damit wäre es möglich die einzelnen Stämme, mit Hilfe einer multiplex PCR, voneinander zu unterscheiden, was eine wesentliche Zeitersparnis zu kultivierungsabhängigen Methoden mit sich bringen würde.

### **1.2.2 Artbeschreibung**

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, die bisher taxonomisch noch nicht eingeordneten, aus *Struthio camelus* isolierten Mykoplasmen anhand molekularer Typisierungsverfahren, sowie morphologischer, serologischer, physiologischer und biochemischer Methoden zu klassifizieren. Mit den so erhaltenen Daten sollten die Mykoplasmen gegebenenfalls dann als neue Art beschrieben werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Mykoplasmenstämme**

#### **2.1.1 Isolate der taxonomisch einzuordnenden Stämme und Referenzstämme:**

Isolate aus der Lunge:

237IA<sup>T</sup>, 237IIA, 238IA, 238IIA, VIA, VIIA

Isolate aus der Nasenhöhle:

1FIA, 1FIIA, 2FIA<sup>T</sup>, 2FIIA

Folgende Mykoplasmen und Bakterien anderer Genera wurden bei der Artbeschreibung als Referenzen für diverse Untersuchungen herangezogen:

*Mycoplasma spumans* C348 PG13<sup>T</sup>

*Mycoplasma equirhinis* NCTC 10148

*Mycoplasma falconis* H/T1<sup>T</sup>

*Mycoplasma glycyphilum* NCTC 10194

*Mycoplasma verecundum* 1449 (Isolat)

*Mycoplasma bovirhinis* PG43<sup>T</sup> NCTC 10118<sup>T</sup>

*Mycoplasma gallinarum* FowL/PG16<sup>T</sup> NCTC 10120

*Mycoplasma arthritidis* PG6<sup>T</sup> NCTC 10162<sup>T</sup>

*Mycoplasma gallisepticum* PG31<sup>T</sup> NCTC10115

*Ureaplasma diversum* Eva1 U4 (Isolat)

*Acholeplasma laidlawii* PG8<sup>T</sup> NCTC 10116

### 2.1.2 *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC Stämme (*MmmSC*)

Die in Tab. 1 genannten Stämme wurden uns von Prof. Joachim Frey (Institut für veterinäre Bakteriologie der Universität Bern, Länggass-Straße 122, CH-3001 Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Ebenso erhielten wir von den genannten Stämmen DNA aus selbigem Labor.

**Tab. 1: In der Arbeit untersuchten Stämme von *MmmSC*.**

<u>Stamm</u>	<u>Isoliert aus</u>	<u>Herkunft / Jahr der Isolation</u>
PG1 <sup>T</sup>	Typstamm, Rind	Herkunft unbekant 1931
0526	Schaf, Milch	Portugal; 1993
4378	Rind	Senegal pre-1968
KH3J	Rind, Impfstamm	Sudan 1940
PO1967	Rind	Frankreich; 1967
Afadé	Rind	Kamerun; 1968
Asmara	Rind	Eritrea; 1970
95014-Mara	Rind	Tansania; 1995
T1/44	Impfstamm	Tansania; 1952
8740	Rind	Caeroun 1987

## **2.2 Kultivierung der Mykoplasmen**

### **2.2.1 Anzucht der Isolate:**

Die Isolate wurden in modifiziertem Hayflick's Medium (MedB) angezogen.

Die in der Arbeit verwendeten Mykoplasmenstämme wurden, bevor sie zu Versuchen herangezogen wurden, 3 mal kloniert/passagiert (Tully, 1983). Hierzu wurden 4ml MedB mit dem Stamm beimpft, indem mit einer Impföse eine Einzelkolonie von der Platte gepickt und in das Flüssigmedium überführt und ein bis zwei Tage bei 37°C inkubiert wurde. Sobald ein Farbumschlag des Mediums sowie eine Trübung zu erkennen war, wurde mit MedB 1:1000 verdünnt. Hiervon wurden 50 µl eingesetzt um eine MedB Agarplatte zu beimpfen. Diese wurde bei 37°C in einer Atmosphäre mit 7% CO<sub>2</sub> bebrütet. Nach dem Ausbilden von Einzelkolonien wurde dann ausgehend von Einzelkolonien wiederum 4 ml MedB beimpft. Dieser Vorgang wurde nun zweimal wiederholt. Von der letzten Platte wurden dann von mehreren Einzelkolonien ausgehend, jeweils 4ml MedB angeimpft. 250 µl Aliquote dieser Kulturen wurden nach eintägiger Inkubation bei 37°C in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Da mit jedem Mal Auftauen und Passagieren die Lebensfähigkeit der Mykoplasmen schlechter wird (Inkubationszeit verlängert sich deutlich; persönliche Mitteilung Simone Muck), wurden zu Beginn ausreichend Aliquote für die Diplomarbeit angelegt.

### **2.2.2 Biomasse für die Stammsammlung:**

Zur Konservierung der Mykoplasmenisolate wurden je 30 ml MedB Kulturen angesetzt. Nachdem Wachstum sichtbar war wurden diese jeweils zu 2 ml aliquotiert, mit 250 µl Pferdeserum versetzt, eingefroren und schließlich gefriergetrocknet. Nach dem Lyophilisieren wurde jeweils ein Ansatz wieder in sterilen dH<sub>2</sub>O suspendiert und auf MedB-Agar ausplattiert, um die Lebensfähigkeit der Mycopasmen zu testen.



### 2.2.2.1 Modifiziertes Hayflick Medium(MedB)

- flüssiges MedB:

Heart Infusion Broth (BD*)	12,25 g
dH <sub>2</sub> O	450 ml

autoklavieren bei 121°C für 20 min

abkühlen lassen auf ca. 55°C dann Zugabe von

1%iger Phenolrot Lösung (Sigma)	1,2 ml
25%igem Hefeextrakt <sup>+</sup> (Merck)	50 ml
Pferdeserum (hitzeinaktiviert) <sup>#</sup> (PAA)	100 ml
0,2%iger Kalbs-Thymus DNA (Sigma)	6 ml
50%iger [w/v] Glucose Lösung (Merck)	12 ml
10%iger Thalliumacetat Lösung (Sigma)	0,5 ml
1 Trockenampulle Penicillin (Sandoz)	1 Million Einheiten (1 Mega I.E.)

- MedB Nährböden:

Heart Infusion Broth	12,25 g
Agar (Oxoid)	6,4 g

autoklavieren bei 121°C für 20 min,

abkühlen lassen auf ca. 55°C, dann Zugabe von

Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	100 ml
25%igem Hefeextrakt	50 ml
0,2%iger Kalbs-Thymus DNA	6 ml

\*BD....Becton Dickernson and Company

<sup>+</sup>hierzu wurde 25% [w/v] Hefegranulat eingewogen und über Nacht am Magnetprüher gelöst. Am folgenden Tag wurde diese Lösung sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

<sup>#</sup>Hitzeinaktivierung des Pferdeserums: das Pferdeserum wird hierzu aufgetaut und dann für 30min in ein 56°C Wasserbad gegeben. Bei höheren Temperaturen denaturieren Bestandteile des Serums. Aus dem selben Grund soll das Medium erst auf ca. 55°C abkühlen bevor man das Serum hinzufügt.

### 2.2.3 Anzucht von *MmmSC*

*MmmSC* Stämme wurden in flüssigem Frey Medium kultiviert. In 15 ml Röhrchen wurden ca. 12 ml Frey Medium aliquotiert. Das Medium wurde mit den *MmmSC* Stämmen angeimpft, welche wir als verschieden dicht bewachsene Flüssigkulturen erhielten. Hierzu wurden 300 µl der Kulturen in das Medium überführt. Es folgte eine 2 bis 3 tägige Inkubation bei 37°C.

#### 2.2.3.1 Frey Medium (nach European Pharmacopoeia 5.6.):

Heart Infusion Broth	2,5 g
dH <sub>2</sub> O	90 ml

autoklavieren bei 121°C für 20 min

Nach dem Abkühlen auf ca. 55°C Zugabe von

essentiellen Vitamine*	0,025 ml
50%iger Glucose Lösung	2 ml
Schweineserum (hitzeinaktiviert) (PAA)	12 ml
1%igem-β- Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (Sigma)	1 ml
1%iger Cystein Hydrochloride Lösung (Roth)	1 ml
0,6%iger Phenol Rot Lösung	5 ml
Penicillin	20000 Einheiten/ml

\*essentielle Vitaminlösung (1000 ml): Biotin 100 mg, Kalziumchlorid 100 mg, Kalziumpantothenat 100 mg, Folsäure 100 mg, i-Inositol 200 mg, Nicotinamid 100 mg, Pyridoxalhydrochlorid 100 mg, Riboflavin 10 mg, Thiaminhydrochlorid 100 mg.

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert und in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert. So wurde sie dann bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

## **2.2.4 DNA Extraktion**

### **2.2.4.1 Extraktion von DNA der *Mmm*SC Stämme unter Verwendung des PrestoSpin D Bug Kit :**

Die DNA wurde mit dem PrestoSpin D Bug Kit (Molzym) (darin enthalten sind die benötigten Mini Spin- Säulen, Collection tubes 1,5 ml, Puffer RS, Puffer RB, Puffer CH, Puffer AB, Puffer WB, Puffer EB; Nicht enthalten sind 70% Ethanol, Lysozym und RNase A), wie in der Anleitung angegeben, im L3-Labor Hetzendorf der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES) DNA extrahiert. Dazu wurden die angewachsenen Kulturen für 2 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl RS Puffer resuspendiert. Nach einer 30 Minuten dauernden Inkubation bei 37°C wurden 250 µl CH Puffer hinzugefügt und sofort für 5 sec gevortext. Nach mindestens 5 min trat eine sichtbare Lyse der Zellen auf, sodass 200 µl AB Puffer hinzugefügt werden konnten und nach 5 sec vortexen, die so erhaltene Lösung auf eine Mini Spin-Säule transferiert werden konnte. Die beladene Säule wurde für 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert und der Säulendurchlauf verworfen. Dann wurden 400 µl WB Puffer auf die Säule pipetiert und abermals zentrifugiert. Nach einem Waschschriff mit 400 µl 70% Ethanol (70% EtOH) welcher ebenfalls auf die Säule geladen wurde, gefolgt von 3 min Zentrifugation bei 13000 rpm, wurde die Mini Spin-Säule in ein 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen eingesetzt. Mit 100 µl 70°C heißem EB Puffer wurde die DNA aus der Säule eluiert. Dazu wurde der Puffer auf die Säule aufgetragen, gefolgt von einer einminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm.

### **2.2.4.2 Extraktion der DNA mit der Freeze-Thaw Methode**

Diese Methode wurde beschrieben von Nilsson et al. (1998). Hierzu wurden die in 15ml Röhrchen angezogenen *Mmm*SC, im ersten Schritt mit 4000 rpm für 40 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, welches mit 14000 rpm für 5 min zentrifugiert wurde. Nun wurde das so erhaltene Pellet in 500µl PBS resuspendiert und abermals zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 µl DNase-, RNase-, und Protease freiem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) (Eppendorf) resuspendiert und über Nacht eingefroren (-80°C). Tags darauf wurden die Zellen direkt aus -80°C, für 10 min auf 100°C erhitzt und mit

13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand, in welchem sich nun die DNA befand, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

- 1xPBS: Phosphat gepufferte Saline

NaCl (Roth)	8 g
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Roth)	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O (Roth)	2,9 g
KCl (Roth)	0,2 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH auf 7,2 einstellen	
autoklavieren	

#### 2.2.4.3 DNA Fällung:

Der DNA Lösung wurden 1/10Vol. NaAcetat (3M, pH7) (Merck) sowie 2 Vol. EtOH p.A. (Merck) (eiskalt) zugefügt. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wird die DNA pelletiert, der Überstand vorsichtig abgehoben und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurde die so getrocknete DNA in ddH<sub>2</sub>O gelöst (über Nacht auf 4°C) und photometrisch vermessen.

#### 2.2.4.4 Extraktion der DNA von *M.struthionis* sp. nov./*M.nasistruthionis* sp. nov. DNA

Es wurde der GenElute™ Mammalian Genomic DNA-Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) [darin enthalten sind Resuspensionslösung, Lysislösung T, Lysislösung C, Säulenvorbereitungslösung, Waschlösung, Elutionslösung (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, pH 9.0) Proteinkinase K, RNase A Lösung, GenElute Miniprep Säulen, Collection Tubes 2 ml)] benutzt und nach der zugehörigen Anleitung vorgegangen. Als Ausgangsmaterial wurden 1,5ml einer gut bewachsenen 4ml MedB Kultur benutzt. Diese wurde bei 14000 g für 10 min pelletiert, dann in 200 µl Resuspensionslösung sowie 20 µl RNase Lösung resuspendiert und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200 µl Lysislösung C sowie 20 µl Protease K Lösung (20 mg/ml) zugefügt und bei 70°C für 10min inkubiert. In dieser Zeit wurden die Filterröhrchen vorbereitet. Dazu mussten diese mit 500 µl einer Vorbereitungslösung beladen und für 1 min bei

12000 g zentrifugiert werden. Nach der 10 minütigen Inkubation wurden noch 200 µl Ethanol (96%) zu den lysierten Zellen zugefügt und nach gründlichem Vortexen die Suspension in das Filterröhrchen überführt. Nach einer 1min Zentrifugation bei 6500 g wurde der Durchlauf verworfen und 500 µl Waschlösung auf den Filter der Röhrchen pipettiert. Abermals wird mit 6500 g für 1min zentrifugiert. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Nun wurde das Filterröhrchen in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 200 µl Elutionspuffer beladen. Nach einer 5 min Inkubation bei Raumtemperatur konnte die DNA durch Zentrifugation bei 6500 g für 1min extrahiert werden.

#### **2.2.4.5 Extraktion von DNA für DNA-DNA Hybridisierung und G+C-% Analyse**

Während die oben beschriebenen Methoden genug DNA für die Anwendung in der PCR liefern, braucht man für andere Zwecke, wie z.B. DNA-DNA Hybridisierung oder Bestimmung des GC(%) Gehalts weit höhere DNA Konzentrationen. Hierzu wurde die Methode von Pitcher et al. (1989) benutzt. Dazu wurde eine Kultur (100-300 ml) mittels Zentrifugation, bei 4000 g für 30 min, geerntet. Es folgten zwei Waschschriffe mit PBS, nach denen das Pellet in 1 ml Lysozym Lösung (50 mg/ml) resuspendiert und im 37°C Wasserbad 45 min inkubiert wurde. Nachdem 5 ml GES Puffer zugefügt worden war, folgte eine weitere 5-45 min Inkubation bei 37°C, bis die Lyse der Zellen eintrat. Dies konnte bei Mykoplasmen schon direkt nach Zugabe des GES Puffers beobachtet werden. Danach wurden 750 µl 25% [w/v] SDS zugefügt und leicht geschüttelt. Weiters wurden 200 µl RNaseA (25 mg/ml, Sigma) zugefügt und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Proteinase K (20 mg/ml; Roth). Nach gründlichem Vortexen und einer weiteren 30 min Inkubation im Wasserbad, wurde der Ansatz auf Eis gestellt (ca. 10 min). Nach Zugabe von 2,5 ml Ammoniumacetat (7,5 M, 4°C) und 10 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 5 ml Chloroform/2-Pentanol (24:1), gefolgt von gründlichem Vortexen. Die obere Phase wurde nach Zentrifugation bei 4000 rpm für 25 min abgehoben und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 0,5 Volumen Chloroform/2-Pentanol wurde abermals zentrifugiert. Die obere Phase wurde wieder abgehoben und zu der bereits überführten Phase zugefügt, mit 0,54 Volumen 2-Propanol versetzt und 1 min

gevor-text. Präzipitierte DNA wurde bei 4000 rpm für 25 min pelletiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Das DNA-Pellet wurde nun 3-mal mit 1000µl 70% EtOH gewaschen und dabei in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Bei diesen Waschvorgängen wurde bei 13000 rpm bei 4°C für 10 min, zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

- Lysozym Lösung: 50 mg/ml(Roth) in TE Puffer
- TE Puffer: 10 mM Tris/HCl (Roth)  
1 mM EDTA (Roth)  
pH8
- GES Puffer: 30 g Guanidin Thiozyanat (Sigma)  
+10 ml 0,5 M EDTA pH8 (Roth)  
+10 ml dH<sub>2</sub>O  
bei 65°C im Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln lösen,  
dann abkühlen lassen  
+2,5 ml 10% Sarkosyl (Sigma)  
ad 50 ml mit dH<sub>2</sub>O  
Sterilfiltrieren und bei Raumtemperatur lagern.

## **2.2.5 DNA Konzentrationsbestimmung**

### **2.2.5.1 Photometrisch**

Hierzu wird die Extinktion der Lösung bei 230nm, 260nm, 280nm und 320nm im Photometer (Biophotometer; Eppendorf) gemessen. Aus den so erhaltenen Werten wird vom Photometer eine Angabe über die DNA Konzentration (µg/µl) gemacht, sowie über die Sauberkeit der vermessenen DNA (Verhältnis von 260:280 bzw. 260:230 nm; Wird hierbei ein Wert  $\geq 1,8$  errechnet so gilt die DNA als ausreichend rein um bei der DNA-DNA Hybridisierung eingesetzt zu werden).

### 2.2.5.2 Chemische DNA Bestimmung

Diese Methode erfolgte in modifizierter Form nach Richards (1974). Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden 25  $\mu\text{l}$  2x SSC und 8,15  $\mu\text{l}$   $\text{HClO}_4$  9,2 M mit 0.25/0.5/0.75/1/1.5/2/3/4  $\mu\text{g}$  Kalbsthymus-DNA und Wasser auf ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gebracht. Dann wurden 30  $\mu\text{l}$  Diphenylamin Reagenz zugefügt und 16-24h bei Raumtemperatur inkubiert. Von der zu messenden DNA wurden 6  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Absorption wurde bei 600nm bestimmt. Die Erstellung der Eichgeraden erfolgte, ebenso wie die Analyse der Probe, im Doppelansatz. Jede der Konzentrationen wurde 4-mal gemessen und aus dem Mittelwert die Eichgerade erstellt. In diese so erhaltene Funktion wurden die Mittelwerte der Proben eingesetzt und auf diese Art berechnet.

- 2xStandard Saline Citrat (SSC)
    - 300 mM NaCl (Roth)
    - 30 mM  $\text{Na}_2\text{Citrat}$  (Merck)
  - Diphenylamin-Reagenz
    - Eisessig (Roth)
    - 0,01% Paraldehyd (Fluka)
    - 4% Diphenylamin (Sigma-Alrich)
- zuerst wurde Paraldehyd der Essigsäure zugefügt, dann Diphenylamin.

## **2.2.6 PCR basierende Methoden**

### **2.2.6.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)**

#### **2.2.6.1.1 Materialien für PCR**

Es wurde die GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega) benutzt. Diese wird mit MgCl<sub>2</sub> (25 mM) und 5x green GoTaq®Flexi buffer (kurz 5x Puffer) geliefert. Als Wasser wurde Mol Bio Grade Water (5Prime) (ddH<sub>2</sub>O) benutzt. Weiters wurden der 4you4 dNTPs Mix 10 mM (Bioron) benutzt. Die Primer wurden über die Firma VBC-Genomics bezogen und in einer Arbeitskonzentration von jeweils 100 pmol/μl eingesetzt. Die verwendeten Thermocycler waren: Eppendorf (Mastercycler) und MWG-Biotech (Primus).

#### **2.2.6.1.2 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte**

Falls nicht anders angegeben erfolgte die Auftrennung der PCR Produkte standardmäßig in einem 1,7% (w/v) Agarosegel. Dazu wurde die Agarose in 1xTAE Puffer unter aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Der 1xTAE Puffer wurde durch Verdünnen aus dem 50xTAE Stock hergestellt.

- 50xTAE Puffer

Tris (Roth)	242,0 g
Eisessig (Roth)	57,1 ml
0,5 M EDTA, pH8	100 ml
ad dH <sub>2</sub> O	1000 ml

Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese in der BioLab DNA sub cell™ Kammer. Für gewöhnlich wurden beim ersten Lauf 5 μl PCR Produkt aufgetragen und falls nötig bei den folgenden Gelen die aufgetragene Menge angepasst. Die Färbung der DNA erfolgte im 2,5 mg/l Ethidiumbromidbad (für ca. 20 min) und wurde unter UV Licht betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines BioRad Geldokumentationsgerätes und der Quantity One Software .



### 2.2.6.1.3 PCR-Primer

Folgende Primer wurden im Rahmen der Diplomarbeit benutzt.

**Tab. 2: RAPD-Primer, 1-15 Birgit Huber / Sabine Amann, 16-34 Stefan Langer**

Name	Sequenz	T <sub>m</sub> C°
Rapd 1a	5'-GTG CCG ACG G-3'	43,6
Rapd 1b	5'-GTG CCG ACG GC-3'	51,4
Rapd 2a	5'-ATA GCC GAC G-3'	33,3
Rapd 2b	5'-ATA GCC GAC GC-3'	41,9
Rapd 3a	5'-TCT GAC CAC C-3'	25,0
Rapd 3b	5'-TCT GAC CAC CG-3'	37,9
Rapd 4	5'-CAG GCT TCC C-3'	36,3
Rapd 5	5'-CGG CAA CGG G-3'	48,6
Rapd 6	5'-GAC TGC GCA C-3'	33,5
Rapd 7	5'-GCG TCA GGA G-3'	32,1
Rapd 8	5'-CCC TTA TGC G-3'	34,5
Rapd 9	5'-AAC AGG GCG G-3'	41,9
Rapd 10	5'-GGA CGC GGT GC-3'	51,4
Rapd 11	5'-GCA CGC ATT GG-3'	44,6
Rapd 12	5'-CTG AGG CTC CC-3'	39,8
Rapd 12(2)	5'-GTT CGT GCG GT-3'	42,2
Rapd 13	5'-CCA CCT CGC A-3'	39,5
Rapd 14	5'-AAA GGA TCG GG-3'	39,9
Rapd 15	5'-TGT GGA GCC C-3'	37,3
Rapd 16	5'-GTA TGT CTA GAA AAG-3'	31,6
Rapd 17	5'-CGT TTC AAT G-3'	24,4
Rapd 18	5'-GTT ACA TCA GTG C-3'	32,4
Rapd 19	5'-TCA ACA AGG TG-3'	28,3
Rapd 20	5'-AAA CAT TAT CTG C-3'	32,4
Rapd 21	5'-CAA CCA GCT ATA G-3'	33,5
Rapd 22	5'-CTT AAA AAG GTT-3'	28,2
Rapd 23	5'-AAG TTT GTT TGC-3'	32,9
Rapd 24	5'-CAA AGT TTG TTT GC-3'	42
Rapd 25	5'-AGT TTG TTT GC-3'	27,9
Rapd 26	5'-ACC TTC CGC-3'	31,2
Rapd 27	5'-AGT TTA GCT GG-3'	27,4
Rapd 28	5'-TTG CTG GGG-3'	34
Rapd 29	5'-AAG TTG TAG CTG-3'	27,9
Rapd 30	5'-CAG CAC CAG C-3'	33,7
Rapd 32	5'-CAG CAC ATT AGT TGA GC-3'	50,6
Rapd 31b	5'-GGT AAT TGC TTA G-3'	33,2
Rapd 33	5'-CAT TCT GAT CAG GGA TTT C-3'	55,6
Rapd 34	5'-CAA CAT CTT TTA ATG TTG TCG-3'	57,6

Tab. 3: entwickelte spezifische Primer basierend auf Sequenzdaten der vorliegenden Arbeit

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>T<sub>m</sub> °C</i>
133-2F	5'-TAG GGA ATG AAA TAC CAG TTA C-3'	55,2
133-2R	5'-CGC ACC TGG GCT AC-3'	55,3
133-7F	5'-CAG TAA TTG ATA CAG CAG G-3'	51,4
133-7R	5'-GTT AAA TTC AGG AGC TGG-3'	53,4
DGGE-1F	5'-(GC-clamp)* G CTG TTG CTA TTG C-3'	45,6
DGGE1-F0	5'-GCT GTT GCT ATT GC-3'	45,6
DGGE1-R	5'-CTT TAA GTT CAG AAT GAG TC-3'	49,1
DGGE-2F	5'-(GC-clamp)* CAT CAA CTA TTT TTG ATG C-3'	51,7
DGGE2-F0	5'-CAT CAA CTA TTT TTG ATG C-3'	51,7
DGGE2-R	5'-CGG ATT ATA CAT ACT TAG TGG-3'	51,9
IS410/R1	5'-AAG TTT TAG AAA GGT TTA AAG G-3'	53,4
IS410/F1	5'-CGC GAC TAA GTG GG-3'	53,3
200/5F	5'-CGT TTC AAT GCA CTA ATA CCC-3'	59,7
200/5R	5'-GGT TCT GCA TTG GGA G-3'	55,9
232/2F	5'-CAA CAA GGT GCA TAC CAG-3'	56,2
232/2R	5'-TCG TTT GCT GTG GAT G-3'	56
106/3R	5'-AGG AAC AAT GAG AAC ACA TG-3'	56,2
106/3F	5'-GTT AGA AAA GGG TGT TCA AAG-3'	55,8
186/5F	5'-TCT GAA AAA GGG TTT AAA GG-3'	56,3
186/5R	5'-AGC ACT GTA TTT TAA ATG TGT-3'	51,9
164/2R	5'-CCC TGA GAT TCT ATT TCT GAA-3'	56,3
164/2F	5'-AGT TAG AAA AGG TAA TTG CTT AGA T-3'	55,8
186/5Fn	5'-TCT GAA AAA GGG TTT AAA G-3'	52,4
200/5F	5'-CGT TTC AAT GCA CTA ATA CC-3'	56

\*GC

Clamp: CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCG CCGGCC GC

**Tab. 4: Primer aus Publikationen**

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Referenz</u>
R2 (ITS)	5'-GCA TCC ACC AAA AAC TCT T-3'	Tang et al., 2000
F2A (ITS)	5'-GTG GGG ATG GAT GGA TCA CCT CCT-3'	Tang et al., 2000
27F	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC-3'	Lane, 1991
1492R	5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	Lane, 1991
S-Rapd 4	5'-AAG AGC CCG T-3'	
VNTR4F	5'-AAT CAG CGT GAT TCA GCT TT-3'	McAuliffe et al., 2007
VNTR4R	5'-TTG CTT TGA TTA ACT TGAT TGT TTT-3'	McAuliffe et al., 2007
MmmSC_1rev	5'-TGA TGA TGT TTG ACA AGA ATA TG-3'	Bischof et al., 2007
MmmSC_23760fwd	5'-AAT AAT AAT GCA GTT CCA AA TC-3'	Bischof et al., 2007

#### **2.2.6.1.4 Amplifizierung der 16S rRNA kodierenden Gene (16S rDNA PCR):**

Die 16S rDNA wurde nach erfolgreicher Amplifikation mit Hilfe des Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega) (siehe 2.2.5.2.) gereinigt und dann bei VBC-SequenzierungService sequenziert.

Ansatz und die Bedingungen für die PCR sind den Tab. 6 und 7 zu entnehmen.

**Tab. 5: Pipettierschema für 16S rRNA Amplifizierung mittels PCR**

Komponenten	Volumen/Ansatz
5xBuffer	10 µl
MgCl <sub>2</sub>	4 µl
dNTP	1 µl
Primer 27f	0,5 µl
Primer 1492r	0,5 µl
Polymerase	1 µl
Template	2 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	50 µl

**Tab. 6: PCR Bedingungen für 16S rRNA Amplifizierung mittels PCR**

Programm	Denaturierung	Zykluszahl	Denaturierung Annealing Elongation	Finale Elongation
			95°C / 1 min	
16SrDNA-PCR	95°C / 5 min	35x	64°C / 1 min	72°C / 5min
			72°C / 1 min 30 sec	

**2.2.6.1.5 ITS-PCR / ARDRA der ITS**

Für die ITS-PCR wurde der ReadyMix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma) benutzt. Ansatz und die Bedingungen sind den Tab. 8 und 9 zu entnehmen.

**Tab. 7: Pipettierschema für 16S- 23S rDNA PCR**

Komponenten	Volumen/Ansatz
Ready Mix	12 µl
Primer F2A	1 µl
Primer R2	1 µl
Template	3 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	50 µl

**Tab. 8: PCR Bedingungen für 16S-23S rDNA PCR**

Programm	Denaturierung	Zykluszahl	Denaturierung Annealing Elongation	Finale Elongation
			94°C / 30 sec	
IST-PCR	94°C / 30 sec	35x	55°C / 2 min	72°C / 5 min
			72°C / 2 min	

Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt. Wenn die PCR erfolgreich war, konnte der Verdau der Produkte vorgenommen werden. Dabei wurden folgende Enzyme benutzt (Tab. 10).

**Tab. 9: Restriktionsenzyme und entsprechende Schnittstellen.**

Enzym	Sequenz an Schnittstelle	
TaqI (Segetica):	5'-T <sup>^</sup> ACGA-3'	3'-AGC <sup>v</sup> T-5'
VspI (Segetica):	5'-AT <sup>^</sup> TAAT-3'	3'-TAAT <sup>v</sup> TA-5'
ApoI (Fermentas):	5'- Pu <sup>^</sup> AATTPy- 3'	3'-PyTTAA <sup>v</sup> Pu- 5'
DdeI (Fermentas):	5'-C <sup>^</sup> TNAG-3'	3'-GANT <sup>v</sup> C-5'

Es wurden 5 µl der in der ITS-PCR amplifizierten DNA eingesetzt, zu welchen 5 µl des Restriktionsenzymgemisches zugefügt wurden (10 u/µl PCR Ansatz). In Kombination wurden *TaqI/VspI* sowie *ApoI/DdeI* benutzt. Der Verdau erfolgte für mindestens 5h oder aber auch über Nacht bei 37°C. Das Ergebnis wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in 2%igem Agarosegel ausgewertet.

### 2.2.6.1.6 RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA)

Der für die RAPD-PCR benutzte Ansatz und die Bedingungen sind den Tab. 11 und 12 zu entnehmen.

**Tab. 3: Pipettierschema für die RAPD-PCR**

Komponenten	Volumen/Ansatz
5xBuffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 µl
dNTP	0,5 µl
Primer	2 µl
Polymerase	0,12 µl
Template	0,5-2 µl
ad ddH <sub>2</sub> O	25 µl

**Tab. 11: PCR Bedingungen für die RAPD-PCR**

Programm	Denaturierung	Zykluszahl	Denaturierung Annealing Elongation	Finale Elongation
			94°C / 1 min	
RAPD-PCR	94°C / 5 min	45x	T <sub>variabel</sub> / 1 min	72°C / 10 min
			72°C / 10 min	

### 2.2.6.1.7 PCR mit spezifischen Primern

Tabelle 12 sind die verschiedenen PCR Ansätze zu entnehmen und Tabelle 14 die zugehörigen PCR Bedingungen.

**Tab. 12: Pipettierschemata der spezifischen PCRs**

Komponenten	Volumen/Ansatz				
	VNTR-PCR	FusA-PCR	PG1spez.-PCR	133/2	232/2
5xBuffer	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	2 µl	2 µl	3,3 µl	3 µl
dNTP	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Primer F	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
Primer R	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl	0,1 µl
Polymerase	0,12 µl	0,12 µl	0,12 µl	0,12 µl	0,12 µl
Template	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Ad ddH <sub>2</sub> O	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

**Tab 13: Bedingungen für die spezifischen PCRs**

Programm	Denaturierung	Zykluszahl	Denaturierung Annealing Elongation	Finale Elongation
PG1spez.-PCR	94°C / 2 min	35x	94°C / 30 sec 48°C / 30 sec 72°C / 3 min	72°C / 10 min
VNTR-PCR	94°C / 5 min	35x	95°C / 5 min 52°C / 45 sec 72°C / 1 min	72°C / 10 min
FusA-PCR	94°C / 2 min	35x	94°C / 30sec 52°C / 30 sec 72°C / 45 sec	72°C / 5 min
133/2-PCR	94°C / 5 min	35x	95°C / 5 min 62°C / 45 sec 72°C / 1 min	72°C / 10 min
232/3-PCR	94°C / 5 min	35x	95°C / 5 min 58,5°C / 45 sec 72°C / 1 min	72°C / 10 min

#### 2.2.6.1.8 DGGE (Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese)

Mit Hilfe der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese ist es möglich PCR Fragmente gleicher Länge aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenz zu trennen. Dabei können einzelne Basenpaaraustausche auf über 500 Basenpaare Fragmentlänge aufgezeigt werden (S.G. Fischer and L.S. Lerman, 1983). Die DGGE wurde mit dem DCode™ Universal Mutation Detection System von BioRad durchgeführt. Die Temperatur des Laufpuffers (1xTAE) wurde auf 60°C eingestellt und die Spannung betrug 150V. Aufbau und Einsatz der Apparatur erfolgten wie in der Anleitung angegeben. Im Gel wurde ein Gradient von 30% nach 80% Formamid/Urea gewählt, wobei es sich bei dem Gel um ein 6%iges Acrylamidgel handelte. Um ein Gradientengel zu gießen, wurde das von BioRad gelieferte System, wie in der Anleitung beschrieben benutzt. Details zur Handhabung sind der Beschreibung zu entnehmen. Die dazu nötigen Lösungen (30% denaturierende Lösung und 80% denaturierende Lösung) sind unten aufgeführt. Die Laufzeit betrug rund 15h. Die Gele wurden wie bereits zuvor (2.2.6.1.2) beschrieben in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt.

Stocklösungen für die DGGE:

- 30%ige denaturierende Lösung/6% Acrylamid:

Acrylamid (40%ig[w/v])-Bisacrylamid (0,8%ig [w/v])	
-Lösung (Applichem)	15 ml
50xTAE Puffer	2 ml
dH <sub>2</sub> O	40 ml
Formamid	12 ml
Urea	12,6 g
- 80%ige denaturierende Lösung/6% Acrylamid:

Acrylamid (40%ig[w/v])-Bisacrylamid (0,8%ig [w/v])	
-Lösung (Applichem)	15 ml
50xTAE Puffer	2 ml
dH <sub>2</sub> O	40 ml
Formamid	24 ml
Urea	25,2 g



bevor das Gel aufgetragen wurde, wurde den jeweiligen Lösungen 0,09% (v/v) 10%ige Ammoniumpersulfat Lösung sowie TEMED zugesetzt.

### **2.2.6.2 Klonierung und Sequenzierung**

Um eine spezifische PCR zu entwickeln wurden spezifische Banden aus genomischen „Fingerprints“ eluiert, durch Klonierung amplifiziert und dann für die Sequenzierung an VBC Genomics Sequenzierservice gesendet.

#### **2.2.6.2.1 Elution**

Bei Vorhandensein einer spezifischen Bande in einem Fingerprint wurde diese PCR in einem größerem Volumen wiederholt. Dieser wurde komplett auf ein Gel aufgetragen und die Bande(n) dann unter UV Licht ausgeschnitten. Mit Hilfe des Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up Systems (Promega) (darin enthalten sind Membran-Bindelösung, Membran-Waschlösung, nuclease-freies Wasser, Wizard®SV Minisäulen, Collection Tubes 2 ml) wurde die DNA dann aus dem Gel eluiert. Hierzu wurde das ausgeschnittene Gel wie in der Anleitung des Kits beschrieben mit 10µl Membran Binding Solution / 10 mg Gel versetzt und für 10min bei 50-65°C inkubiert. Diese Lösung wurde dann in eine SV Minicolumn transferiert und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Es folgte ein Waschschriff, in welchem 700 µl Membran Wash Solution auf die Säule geladen wurden um dann bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert zu werden. In einem zweiten Waschschriff wurden 500 µl der Lösung aufgetragen und für 5 min wie oben beschrieben zentrifugiert. Um die SV Minicolumn zu trocknen folgte eine 1 min Zentrifugation wobei der Deckel des Rotors nicht aufgesetzt wurde, um eine Verdunstung eventuell noch vorhandenen Ethanolis zu ermöglichen. Vor der Elution aus der Säule erfolgte eine 1 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 30 µl nucleasefreiem Wasser. Die DNA wurde in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen durch Zentrifugation mit 14000 rpm für 1 min eluiert. Diese konnte in ein Plasmid kloniert werden.

#### 2.2.6.2.2 Klonieren

Die zu klonierenden Fragmente wurden mittels des pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) (darin enthalten sind pGEM®-T Easy Vektor, T4 DNA Ligase, 2x Ligations Puffer) in den zu dem System gehörigen Vektor ligiert, wie in der zugehörigen Anleitung beschrieben (siehe auch Tab. 14 für den Ligationsansatz). Die Ligation wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Die Vervielfältigung des Plasmids erfolgte in kompetenten *E.coli* DH10, in welche das Plasmid mittels Elektroporation (Gene Pulser, Biorad) eingeführt wurde. Dazu wurden 5 µl des Ligationsansatzes auf Eis mit 50 µl angetauten kompetenten *E.coli* vereint und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach erfolgter Transformation wurde zu den Zellen sofort 1ml SOC Medium zugefügt und ca. 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in 200 µl SOC resuspendiert um je 100 µl davon auf LB/Amp/X-Gal/IPTG Platten auszuplattieren. Inkubation erfolgte dann über Nacht bei 37°. Der Erfolg wird mittels Blue/White Screening bewertet. Die kompetenten Bakterien sowie das SOC Medium wurden von Birgit Huber zur Verfügung gestellt.

Transformanten, welche ein Plasmid mit Insert enthielten (weiße Kolonien), wurden gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

**Tab. 14: Pipettierschema des Ligationsansatzes**

Komponente	Volumen
2xRapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µl
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1 µl
PCR Produkt / eluierte DNA	3 µl
T4 DNA Ligase	1 µl

- LB – Medium:

Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
dH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
pH auf 7.0 einstellen vor dem Autoclavieren.	

- LB – Agar mit Ampicillin:  
zu obigem Medium wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ampicillin zugesetzt, zu einer Endkonzentration von 100µg/ml. Gelagert wurden die antibiotikahältigen Platten bei 4°C.
- Ampicillin Stammlösung:  
50 mg Ampicillin /ml dH<sub>2</sub>O
- LB/Amp/X-Gal/IPTG Platten:  
Hierzu wurden auf den LB-Platten je 100 µl einer 100mM IPTG Lösung sowie 20 µl einer 50mg/ml X-Gal Lösung ausplattiert. Zum Trocknen wurden die Platten für mindestens 30 min bei 37°C gelagert bevor sie benutzt wurden.
- SOC-Medium:
 

Pepton	2 g
Hefeextrakt	0,5 g
1 M NaCl	1 ml
1 M KCl	0,25 ml
2 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
2 M Glucose	1 ml

Pepton, Hefeextrakt, NaCl und KCl wurden zuerst in 97 ml dH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war wurden die restlichen Lösungen zugesetzt und auf 100 ml mit sterilen dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der pH- Wert wurde auf 7.0 eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde das Medium bei 4°C gelagert.

- 2 M MgSO<sub>4</sub>- Stammlösung:

MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O (Merck)	20,33 g
MgSO <sub>4</sub> •6H <sub>2</sub> O (Merck)	24,65 g
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
sterilfiltrieren	

#### 2.2.6.2.3 Plasmid Miniprep.

Die Gewinnung der Plasmide aus der Klonierung erfolgte mit Hilfe des peqGold Plasmid Miniprep Kits (PeqLab). Es wurde nach der Anweisung des Herstellers vorgegangen. Die 5ml Kultur wurde pelletiert (1min bei 10000 g) und dann in 250 µl Lösung I / RNase A resuspendiert. Danach wurden 250 µl Lösung II zugefügt und nach mehrmaligem Invertieren des Tubes entstand ein klares Lysat. Dieses wurde mit 350 µl Lösung III versetzt und abermals invertiert bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildete, welches bei 10000 g für 10 min pelletiert wurde. Der Überstand wurde auf die HiBind<sup>®</sup>-Miniprep-Zentrifugensäule geladen, ohne etwas von dem Präzipitat zu überführen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (1min bei 10000 g), nach welchem der Durchfluss verworfen und auf die Säule 500 µl HB-Puffer pipettiert wurde. Nach einer Zentrifugation mit 10000 g für 1min folgten zwei weitere Schritte mit HB-Puffer (750 µl) wie bereits beschrieben. Dann wurde durch Zentrifugieren bei maximaler rpm für 1 min die Säule getrocknet. Um die Plasmide zu eluieren wurden 50 µl Elutionspuffer auf die Säule aufgetragen und für 1min bei 10000 g zentrifugiert.

Zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung, wurden 8,3 µl Plasmid-DNA mit 0,7 µl *Eco*RI (Fermentas) und 1 µl 10x *Eco*RI Buffer (Fermentas) für 2h bei 37°C verdaut. In dem Plasmid gibt es an den multiple cloning sites verschiedene Restriktionsschnittstellen zur Entfernung der DNA aus dem Plasmid, darunter auch jene für *Eco*RI. Der Restriktionsverdau wurde dann auf einem 1,7% Agarosegel aufgetragen und auf den erfolgreichen Verdau sowie die gewünschte Fragmentlänge kontrolliert. Das so erhaltene Plasmid wurde, nachdem es auf das Vorhandensein des gewünschten DNA Fragments untersucht wurde, zum Sequenzieren eingesendet.

### **2.2.6.3 Primer Design**

Aus den durch die Sequenzierung erhaltenen Daten wurden Primer konstruiert, welche spezifische Produkte bekannter Größe liefern sollten, wobei darauf geachtet wurde, dass die Annealing Temperatur möglichst zwischen 58°C und 68°C lag. Für die RAPD-PCR, in welcher man Primer einer Länge von ca. 10 Nukleotiden Länge wählt, lag die Annealingtemperatur deutlich darunter, wie den Tab. 2 und 3 zu entnehmen ist. Da die Primer unspezifisch zu wählen waren (Welsh and McClelland, 1990; Williams et al., 1990) ließ sich das, aufgrund des niedrigen GCmol% Verhältnisses, nicht verhindern.

### **2.2.6.4 GC mol% Gehalt**

Der GC mol% Gehalt wird mittels High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) bestimmt. Als mobile Phase wurde 0,1 M, 0,2 M bzw. 0,6 M (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Roth) mit 5% Acetonitril (Roth) benutzt, bei einer Flussrate von 1 ml/min. Als stationäre Phase diente eine RP-18 Säule Hypersil® 5µm 240x4,6 mm. Die Temperatur wurde auf 30°C gesetzt. Detektion der Nukleoside erfolgte bei 270 nm. Als Referenzen wurden in ddH<sub>2</sub>O gelöstes Cytidin, Guanosin und Thymidin (alle von Sigma) benutzt.

#### **2.2.6.4.1 Probenaufbereitung für GCmol% Gehalt Bestimmung:**

Es wurde nach einer von Mesbah et al. (1989) beschriebenen Methode in modifizierter Form vorgegangen. Dazu wurde die in Wasser gelöste DNA mit 2xTE Puffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA) auf 12 µl einer 0,1-0,5 µg/µl DNA Lösung von 10 mM Tris/HCl pH8, 1 mM EDTA Endkonzentration gebracht und für 5 min bei 100°C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt und nach der Zugabe von 12 µl Nuclease P1 (Sigma) 90min bei 50°C inkubiert. 12 Units SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Promega) wurden mit der passenden Menge 10x SAP-Puffer (Promega) zugegeben und für 3-24h bei 37°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden dann 10-15 µl mittels HPLC analysiert. Die Berechnung des GC% Gehalts erfolgte über die Peakfläche für Guanosin, Cytidin, Adenosin, Thymidin.

$$\text{GCmol\%} = (G+C)/(G+C+A+T)*100$$

Weiters wurden Antarctic Phosphatase (NEBiolabs), sowie Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (NEBiolabs) mit den zugehörigen Puffern, sowie Shrimp Alkaline Phosphatase (Sigma) mit 12 µl Glyzinpuffer benutzt. Insgesamt wurden also vier verschiedene alkalische Phosphatasen erprobt.

### **2.2.6.5 DNA-DNA Hybridisierung**

Die Methode, erstmals von Ziemke et al. (1998) beschrieben, wurde hierzu unter Modifikationen benutzt.

#### **2.2.6.5.1 DNA Markierung**

2 µg DNA wurden mit Digoxigenin-11-dUTP und Biotin-16-dUTP doppelmarkiert. Hierzu wurde das Nick Translation Kit (Roche) nach Herstellerprotokoll benutzt. Es wurden 10 µl dNTP Mix (je 3 Vol. dGTP, dCTP, dTTP, dATP und 1 Vol DIG-11-dUTP:Biotin-16-dUTP (0,75:0,25), 2 µl 10xNick Translation Buffer, 2 µg DNA, 2 µl Enzymmix (DNA Polymerase I, DNase I)) mit ddH<sub>2</sub>O auf 18 µl Endvolumen gebracht. Dies geschah in einem Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis. Nachdem der Reaktionsansatz vermischt wurde, wurde für 90 min bei 15°C inkubiert. Durch 10 minütiges Inkubieren auf Eis wurde die Reaktion gestoppt und 380 µl ddH<sub>2</sub>O, 45µl 3M NaAcetat pH7 sowie 890 µl Ethanol p.A. zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren und Inkubation bei -20°C für 30 min wurde die DNA gefällt. Die Trocknung der DNA erfolgte bei Raumtemperatur, nachdem sie durch 15 min Zentrifugieren bei 16000 g pelletiert wurde. Dann wurde die DNA in 200 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.6.5.2 Bewertung der Markierung**

Hierzu wurden 2 µl der zuvor aufgekochten, markierten DNA, zu 800 µl PBS, 0,1% BSA (SAFC) zugefügt. 400 µl dieser Lösung wurden wiederum mit 400 µl PBS, 0,1% BSA verdünnt. Nun wurden je 200 µl der beiden so hergestellten Lösungen in eine Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (Strapwell High Bind, Roche) pipettiert und für 3 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Negativkontrolle diente obig genannte PBS, 01% BSA Lösung ohne DNA.

Die Platte wurde dann 3-mal mit PBS gewaschen und abermals 30 min unter obigen Bedingungen inkubiert, nachdem 200 µl PBS, 0,1% BSA und Anti-Digoxigenin

Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Roche 5000:1) zugefügt wurden. Danach wurde wieder 3-mal mit PBS gewaschen. Für die Farbreaktion wurden 250 µl p-Nitrophenylphosphat (Sigma – 1Tablette in 5ml Blocking Lösung) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 20 min und 60 min wurde bei 405nm die Farbentwicklung gemessen (ELx800™ Absorbance Microplatereader, BIO-TEK®). Bei raschem Anstieg der Absorptionswerte und deutlichem Unterschied zwischen den beiden Verdünnungen konnte die Markierung als positiv bewertet werden.

- Blockinglösung:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (Roth)	7,5 mM
NaHCO <sub>3</sub> (Roth)	15,5 mM
MgCl <sub>2</sub> (Fluka)	1 mM
pH 9,6	

#### 2.2.6.5.3 DNA-DNA Hybridisierung

15 µg unmarkierte DNA und 15 µl markierte DNA wurden auf 57 µl Endvolumen gebracht (ddH<sub>2</sub>O) und 5min bei 100°C denaturiert. Da die Reaktion in 200 µl PCR Tubes durchgeführt wurde, erfolgte die Denaturierung und die folgende Inkubation im MWG Thermocycler. Danach wurde der Ansatz 4 min auf Eis gestellt. Der Zugabe von 28 µl 1 M PB folgte ein Übersichten mit drei Tropfen Mineralöl. Zur Hybridisierung wurde für 16h bei T<sub>m</sub> -30°C inkubiert. Für die Berechnung der T<sub>m</sub> wurde der GC% Gehalt des nächsten Verwandten herangezogen, in diesem Fall *M.spumans*. Die Berechnung der T<sub>m</sub> erfolgte nach der Formel:

$$T_m = [ \%(G+C) + 182,2 ] / 2,44$$

Nach der 16h Inkubation wurden 100 µl ddH<sub>2</sub>O zu jedem Ansatz (1 homologer Ansatz, sowie 5 heterologe Ansätze) hinzugefügt. Hiervon wurden dann 50 µl in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit Hydroxyapatit (bereits vorbereitet und bei 4°C gelagert) überführt. Dies geschieht im Doppelansatz. Das Mineralöl darf dabei nicht überführt werden, und eventuelle Reste mussten vorsichtig mit einem Papiertuch entfernt werden. Die Proben wurden kräftig gevortext und dann für 15 min bei T<sub>m</sub>-35°C inkubiert. Es

wurden 450 µl 0,14 M PB, 0,2% SDS zugefügt, abermals kräftig gevortext und bei Tm-35°C für 5 min inkubiert. Das Hydroxyapatit wurde mit 16000 g für 1 min abzentrifugiert. In dem Überstand befand sich nun die ssDNA (einzelfsträngige DNA), welche in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Dieser Schritt wurde mit 500 µl 0,14 M PB, 0,2% SDS wiederholt. Die dsDNA (doppelsträngige DNA) konnte eluiert werden, indem 200 µl 0,4 M PB zugefügt und nach 5 min Inkubation wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Der Schritt wurde 2-mal durchgeführt. Die Überstände wurden wieder in ein Eppendorfgefäß überführt.

Je 200 µl der dsDNA und der ssDNA wurden, nachdem sie mit 0,1% BSA versetzt worden waren, in einer Streptavidin beschichteten Microtiterplatte für 2h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Wells 3-mal mit 1x PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 200 µl Antidigoxygenin Antikörper in PBS, 0,1% BSA (1:5000) erfolgte eine 1h Inkubation bei Raumtemperatur unter Schütteln. Es wurde wiederum 3-mal mit 1x PBS gewaschen und 250 µl p-Nitrophenylphosphat zugegeben, um dann bei 37°C zu inkubieren. Detektion erfolgte wie schon bei der DNA-Markierung beschrieben.

- Phosphat Buffer 1M (PB):

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Roth) 1 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merk) 1 M

pH 6,9; dazu Lösungen mischen bis gewünschter pH erreicht ist.

- Hydroxyapatit Präparation:

Hydroxyapatit (DNA Grade Bio-Gel®http Gel, Bio-Rad) 1 g

0,14 M PB 10 ml

In einem kleinem Becherglas am Magnetrührer unter ständigem Rühren zu je 200 µl in Eppendorfgefäße aliquotieren. Die Eppendorfreaktionsgefäße werden für 1min mit 16000 g zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes bei 4°C gelagert.



#### **2.2.6.5.4 Berechnung der Hybridisierung**

Die Berechnung erfolgt nach den Formeln

$$BR = [(DS*2)/(SS*5+DS*2)]*100$$

BR .... binding ratio

$$RBR = [BR_{Heteroduplex}/BR_{Homoduplex}]*100$$

RBR .... Relative binding ratio

Die Binding Ratio gibt den Grad der Reassoziaton an. Dieser beschreibt den Prozentsatz der markierten DNA, welche mit der dsDNA bzw. ssDNA bindet. Die Relative Binding Ratio gibt an wie viel Prozent die heterologe DNA, bezogen auf die homologe DNA, ausmacht. Zur Berechnung werden jeweils die Mittelwerte der einzelnen Messungen herangezogen. Liegt die RBR über 70% so handelt es sich um dieselbe Art.

### **2.2.7 Gewinnung von Hyperimmunseren**

#### **2.2.7.1 Ganzzellpräparation**

Als Medium zur Anzucht der Mykoplasmen dienten 500 ml MedB, welches ohne Penicillin und Thalliumacetat zubereitet wurde. Es wurden 4 ml MedB benutzt um die Stämme 237IA<sup>T</sup> bzw. 2FIA<sup>T</sup> anzuziehen. Damit wurde dann die 500 ml Kultur beimpft. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C waren die 500 ml Kulturen gut bewachsen und wurden mit 10600 rpm für 30 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2-mal in Saline gewaschen und danach in 20 ml Saline resuspendiert und zu je 1 ml Aliquoten bei -80°C gelagert.

#### **2.2.7.2 Immunisierung der Kaninchen**

Ein 1 ml Aliquot wurde 1:1 mit dem Adjuvant LQ (Gerbu) vermenget und nach gründlichem Vortexen dem Kaninchen durch den Tierarzt subkutan verabreicht.

Dies erfolgte am 1.Tag sowie am 22. und 42. Tag (Boost 1 und 2). Am 49. Tag erfolgte eine Blutabnahme um mit einer Westernblot Analyse festzustellen ob Antikörper gebildet wurden. Am 52. Tag wurden die Tiere mittels Herzpunktion entblutet.

### **2.2.7.3 Gewinnung des Hyperimmunserums**

Das für mehrere Stunden (über Nacht) im Kühlschrank aufbewahrte Blut wurde bei 12000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand stellt das Hyperimmunserum da. Dieses wurde abgehoben und bei -20°C gelagert.

## **2.2.8 Protein und Antigenprofile**

### **2.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Ausführung erfolgte in Anlehnung an Laemmli (1970).

#### **2.2.8.1.1 Vorbereitung der SDS-PAGE**

Proteinaufbereitung: Aus 4 ml Kulturen MedB wurden die Zellen abzentrifugiert (13000 rpm, 5min) und 2-mal mit PBS gewaschen. Die Pellets wurden dann in 50-100 µl Spaltpuffer resuspendiert (je nach Größe des Pellets) und für 5 min auf 95°C erhitzt. Die so denaturierten Proteine könnten bei 4°C einige Tage im Kühlschrank gelagert werden. Nach eventuellem Einfrieren sollten sie vor Gebrauch aber nochmals denaturiert, d.h. aufgekocht werden.

- Spaltpuffer (2fach)

Harnstoff (Oxoid)	0,6 g
0,5M Tris-Lösung pH8,8 (Roth)	2,5 ml
Glyzerin (Roth)	2 ml
10%ige (w/v)-SDS-Lösung (Serva)	4 ml
2-Mercaptoethanol (Sigma)	1 ml
dH <sub>2</sub> O	0,5 ml
1 Spatelspitze Bromphenolblau (Serva)	
portionieren und bei -20°C Lagern	

Trenn/Sammelgel: es wurden 10%ige Trenngele benutzt. Diese wurden in der Hofer™ miniVE Vertical Electrophoresis System gegossen.

- 10%iges Trenngel:

Acrylamid (30%ig[w/v])-Bisacrylamid (0,8%ig [w/v])	
-Lösung (Applichem)	5 ml
SDS-Lösung (10%ig [w/v])	200 µl
1,5M Tris-Lösung pH8,8	2 ml
30%ige Harnstofflösung (w/v)	2 ml
dH <sub>2</sub> O	7,9 ml
10%ige Ammoniumpersulfat Lösung (w/v) (Merck)	200 µl
TEMED (Applichem)	8 µl

- Sammelgel:

Acrylamid (30%ig[w/v])-Bisacrylamid	
(0,8%ig [w/v])-Lösung	750 µl
SDS-Lösung (10%ig [w/v])	60 µl
1,5M Tris-Lösung pH8,8	750 µl
30%ige Harnstofflösung (w/v)	600 µl
dH <sub>2</sub> O	3,8 ml
10%ige Ammoniumpersulfat Lösung (w/v)	60 µl
TEMED	6 µl

#### 2.2.8.1.2 SDS-PAGE

Es wurden jeweils ca. 15-25 µl Probe aufgetragen und bei 130 V in oben genannter Apparatur in dem bereiteten Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde gestoppt bevor der Blaumarker das Gel verlassen hatte, also die Laufmittelfront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Als Größenmarker wurde der PageRuler™Prestrained Protein Ladder (4 µl) (Fermentas) aufgetragen. Als Elektrodenpuffer diente der von Laemmli (1970) beschriebene.

Das so erhaltene Gel konnte nun Coomassie gefärbt werden oder für einen Westernblot weiterbenutzt werden.

- Elektrodenpuffer (Laemmli 1970)

Tris	12,12 g
Glycin (Roth)	57,6 g
10%ige (w/v) SDS-Lösung	40 ml
ad dH <sub>2</sub> O	4000 ml
pH 8,3	

### 2.2.8.1.3 Coomassieblau Färbung

Das Gel wurde mit Coomassie Färbelösung überschichtet und unter leichtem Schwenken 20 min gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel in Entfärbelösung leicht geschwenkt. Das so gefärbte Gel konnte dokumentiert (Fotoapparat; GelDokumentation, BioRad) werden und dann mit Hilfe eines Gelrockners konserviert werden.

- Coomassie Blau Lösung:

Methanol (Roth)	500 ml
dH <sub>2</sub> O	400 ml
Eisessig	100 ml
Coomassie Blau (Merck)	2,5 g

- Coomassie Entfärbelösung

Methanol	700 ml
Eisessig	100 ml
dH <sub>2</sub> O	200 ml

### 2.2.8.2 Westernblot

Bei einem Westernblot werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, nachdem sie auf eine Nitrozellulose Membran übertragen wurden, von primären Antikörpern gebunden. In einem zweiten Schritt wurden sekundäre Antikörper und eine an diese gekoppelte enzymatische Reaktion (in diesem Fall alkalische Phosphatase welche eine

Farbreaktion mit 4-Chloro-1-Naphtol katalysiert) benutzt um die vom primären Antikörper gebundenen Proteine sichtbar zu machen.

#### **2.2.8.2.1 Proteintransfer**

Die Proteine müssen vom Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose übertragen werden. Dazu wurde eine horizontale Blotkammer folgenden Aufbaus benutzt: Anode - Filterpapier (3 Schichten) - Nitrozellulose – Gel – Filterpapier (3 Schichten) – Kathode. Bei einer Spannung von 14 V, und einer Stromstärke von 180 mA wurden für ca. 1 Stunde die Proteine auf die Membran übertragen.

- Twobin Puffer:

Tris	12,12 g
Glycin	57,64 g
dH <sub>2</sub> O	300 ml
Methanol	800 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 4000 ml
pH 8,3	

#### **2.2.8.2.2 Detektion mit Serumantikörpern**

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen wurde die Nitrozellulosemembran für 2h bei Raumtemperatur mit einer Blockierlösung (Roth) unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach 3-mal 10-minütigen Waschgängen mit PBS Tween wurde die Membran über Nacht unter dem Abzug getrocknet. Dann konnte die Membran für 2h mit den primären Antikörpern (Hyperimmunseren) in einer 1:1000 Verdünnung (in 1xPBS) inkubiert werden. Es folgte 3-mal 10-minütiges Waschen mit PBS-Tween. Danach wurde die Membran für 2h mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit IgG-HRP; Sigma) unter leichtem Schwenken inkubiert. Dann wurde 2-mal für 10 min mit PBS-Tween gewaschen. Der dritte Waschvorgang erfolgte mit PBS. Die Substratlösung konnte nun zugefügt werden. Sobald eine Färbung der Banden sichtbar wurde, konnte die Reaktion durch Zugabe von Leitungswasser gestoppt werden.

- Blockierlösung
 

Roti®-Block 10xKonzentrat (Roth)	10 ml
dH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
  
- Chlornaphtol Lösung
 

4-Chlor-1-Naphtol (Sigma)	12 mg
Methanol	4 ml
  
- Chlornaphtol Substratlösung
 

Chlornaphtol Lösung	4 ml
PBS	20 ml
30%iges H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 µl
  
- PBS-Tween
 

Tween®-20 (Merck)	1 ml
PBS	ad 1000 ml

#### **2.2.8.2.3 Kolonieimmunoblot**

Beim Kolonieimmunoblot werden Oberflächenproteine von Bakterienkolonien auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde auf eine Platte mit Einzelkolonien eine zugeschnittene Nitrozellulosemembran gelegt. Es erfolgte eine 30 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Membran, auf welcher sich dann die Oberflächenproteine befinden, wurde dann für 2h mit dem primären Antikörper inkubiert und wie in 2.2.8.2.2. beschrieben, weiter damit verfahren.

#### **2.2.8.2.4 Wachstumshemmung in der Anwesenheit von Serum**

Dieser Versuch wurde nach einer Methode von Joachim Spargser durchgeführt. Dazu wurden 100 µl einer Mykoplasmenkultur als Streifen auf einer MedB Platte aufgetragen. Nachdem die Kultur angetrocknet war wurde ein kleines Loch in den Agar

unter dem Streifen gestanzt, in welches direkt Serum aufgebracht wurde. So wurden die Platten dann unter 7% CO<sub>2</sub> Atmosphäre bei 37°C inkubiert.

## **2.2.9 Chemotaxonomische Methoden**

### **2.2.9.1 Polare Lipid-Analyse mittels zwei dimensionaler Dünnschicht Chromatographie (2D-TLC)**

#### **2.2.9.1.1 Biomasseanzucht für Extraktion polarer Lipide:**

Für die Extraktion der polaren Lipide werden ca. 100 mg lyophilisierte Biomasse benötigt. Hierzu wurden die Bakterien in 500 ml MedB angezogen. Die möglichst dicht bewachsenen Kulturen wurden dann für 40 min mit 8000 rpm abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet in Saline (0,9% NaCl Lösung) resuspendiert und 15 min bei 12000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde eingefroren (-80°C) und schließlich gefriergetrocknet (Telstar Cryodos).

#### **2.2.9.1.2 Extraktion der Polaren Lipide**

Die Extraktion und Analyse erfolgte nach den Methoden, welche in Altenburger et al. (1996), Tindall et al. (1990) und Worliczek et al. (2007) beschrieben wurden.

Die lyophilisierte Biomasse wurde mit 2,5 ml Chloroform, 5 ml Methanol und 2 ml 0,3% NaCl Lösung versetzt. Nach gründlichem Begasen mit N<sub>2</sub> wurde sie für 15min auf 80°C erhitzt. Dann wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und in Glaszentrifugenröhrchen überführt um bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde zu 5ml Chloroform/0,3% NaCl (1:1, v/v) gegeben und erneut zentrifugiert, nachdem gründlich gevortext wurde. Die untere Chloroformphase wurde mit einer Pasteurpipette in ein Glasröhrchen überführt und mit N<sub>2</sub> vollständig eingengt. Die so enthaltenen polaren Lipide wurden dann in einem 2:1 Chloroform/Methanol Gemisch bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.2.9.1.3 Analyse des Lipidmusters**

Bei der Analyse handelt sich um eine 2D Chromatographie auf Dünnschichtplatten (Alugram®SIL G/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel). Die mobile Phase der ersten Dimension

besteht aus Chloroform:Methanol:Wasser im Verhältnis 65:25:4. Die mobile Phase der zweiten Dimension aus Chloroform:Methanol:Eisessig:Wasser im Verhältnis 80:12:15:4. Zuerst wurden die Platten, nach Auftragen der Probe, in der ersten Dimension laufen gelassen, dann nach einer ca. 20 min Trocknungszeit, in der zweiten Dimension. Die Detektion der Lipide erfolgte mit Hilfe mehrerer Sprühreagenzien (siehe Tab. 15). Basierend auf der Farbreaktion und geographischen Anordnung der Lipide zueinander konnten so eine Reihe polarer Lipide identifiziert werden.

**Tab. 15: Sprühreagenzien für die Analyse der polaren Lipide**

<u><i>Sprühreagenz</i></u>	<u><i>Detektiert</i></u>	<u><i>Entwicklung bei</i></u>	<u><i>Färbung</i></u>
Molybdätophosphorsäure	Gesamtlipide	120°C	dunkelblau
Molybdenum Blue	Phospholipide	RaumTemp.	blau
Ninhydrin	Aminolipide	120°C	hellrot
Dragendorff Reagenz	tertiäre Stickstoffgruppen	120°C	orange
$\alpha$ -Naphthol	Glycolipide	100°C	rot-violett

- Ninhydrin

Ninhydrin (Riedel-de Haen)

0,2 g

Ethanol p.A. (Roth)

100 ml

- Molybdenum Blue

Molybdenum Blue Spray Reagent, 1,3% (Sigma)

- Dragendorff

Dragendorff Reagenz (Merck)



- $\alpha$ -Naphthol

#### Lösung A

$\alpha$ -Naphthol (Merck, 15% in p.A.(Roth))	150 ml
Chloroform:Methanol 25:30 (v/v) (Roth)	850 ml

Lösung A	8,4 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Merck)	5,2 ml
Ethanol p.A. (Roth)	32,2 ml
dH <sub>2</sub> O	3,2 ml

- Molybdatophosphorsäure

Molybdatophosphorsäure (Merck)	10 g
Ethanol p.A. (Roth)	100 ml

### 2.2.9.2 Koloniemorphologie

Die Morphologie der Mykoplasmenkolonien wurde mit einem Stereomikroskop (Fa. Olympus) sowie mit einem Lichtmikroskop (Nikon, Optiohot-2) untersucht.

Dazu wurden Einzelkolonien auf einer MedB Agarplatte bei bis zu 1000facher Vergrößerung betrachtet.

### 2.2.9.3 Zellmorphologische Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskop (REM)

#### 2.2.9.3.1 Proben Präparation

Zuerst wurden Deckgläser der passenden Größe (20x20 mm) mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet. Hierzu wurden die Deckgläser gründlich in 70% Ethanol gewaschen um sie von eventuellen Rückständen zu befreien und danach gründlich mit dH<sub>2</sub>O vom Alkohol befreit. Poly-L-Lysin wurde, wie in der zugehörigen Anleitung angegeben, 1:10 verdünnt und die Deckgläser dann für 10 min in Poly-L-Lysin inkubiert. Danach

konnten die Deckgläser bei 60°C im Ofen (2h) oder unter dem Abzug (über Nacht) getrocknet werden.

Die Mykoplasmakulturen wurden direkt auf dem Deckglas angezogen. Dazu wurden von einer bereits beimpften und angewachsenen Kultur 200 µl direkt auf das Deckglas aufgebracht und über Nacht entsprechend inkubiert (37°C, 7% CO<sub>2</sub>). Man kann auch Kulturen anwachsen lassen, abzentrifugieren und in geringerem Volumen resuspendieren um so auf dem Deckglas eine höhere Zelldichte zu erreichen.

Waschen des inkubierten Deckglases: Das Deckglas wurde zuerst 3-mal mit PBS gewaschen, gefolgt von zwei Waschschritten mit Cacodylatpuffer für jeweils 10 min. Dann wurde die Probe in Cacodylatpuffer, 2,5% Glutaraldehyd (Sigma) für 1-2h bei 4°C fixiert. Erneut wurde für je 10 min, 3-mal mit Cacodylatpuffer gewaschen, um das gesamte Glutaraldehyd zu entfernen. Es folgte eine Waschreihe mit Ethanol in steigenden Konzentrationen. Zuerst wurde kurz mit 30%igem Ethanol gespült. Dann folgte ein jeweils 5min Waschschriff mit 30%, 50%, 70% und 90% Ethanol. Schließlich wurde 2-mal 5 min mit 95% und 5-mal 5 min mit 100% Ethanol gewaschen. Weiters wurde dann 3-mal für 10 min mit Isoamylacetat (Merck) gewaschen.

Die Deckgläser wurden nun in die Kammer des Trockners eingesetzt und mit Isoamylacetat überschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Der Trockner (BAL-TEC CPD 030) selbst wurde zuvor auf 10°C abgekühlt. Die Kammer wurde in den Trockner eingesetzt und mit flüssigem CO<sub>2</sub> geflutet. Dieses ersetzte nach und nach das Isoamylacetat. Dazu wurde die Kammer rund 10-mal für 10 min mit CO<sub>2</sub> gefüllt, knapp bis zur Hälfte entleert und wieder mit CO<sub>2</sub> gefüllt. Dann wurde die Kammer auf 37°C erwärmt, bis der Druck ca. 90 Bar erreichte. Das Auslassventil konnte nun langsam geöffnet und der Druck langsam abgelassen werden. Die Proben mussten ab diesem Zeitpunkt in einer Vakuumlöcke aufbewahrt werden.

Probenbeschichtung mit Argon und Gold: Die Deckgläser wurden mit einem Glasschneider auf für den Probenblock passende Größe zugeschnitten und auf diesem

befestigt. Dann wurden sie mit Hilfe des Beschichters (Fisons Instruments, Polaron SC7640) bei 20 mA für 90 sec unter Argonatmosphäre mit Gold beschichtet.

Die Proben wurden dann mit einem JSM5410LV Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

- Cacodylatpuffer

Cacodylat (Serva)	0,1 M
ad dH <sub>2</sub> O	100 ml
pH 7,4	

#### **2.2.9.4 Filtrierbarkeit**

Die Filtrierbarkeit wurde mit Filtern der Porengröße 0.22 µm, 0.45 µm sowie 0.88 µm getestet. Dicht bewachsene MedB Kulturen wurden in einer sterilen Spritze aufgezogen und durch den Filter filtriert. Die ersten Tropfen wurden verworfen, der vierte Tropfen dann auf eine MedB Agarplatte aufgebracht. Von der bewachsenen Kultur wurde auch direkt eine MedB Platte beimpft, um eine Wachstumskontrolle zu haben.

### **2.2.10 Physiologische Charakterisierung**

#### **2.2.10.1 Resistenz gegenüber Penicillin**

Da in dem MedB Flüssigmedium Penicillin vorhanden ist, wurde mit jeder Kultivierung die Resistenz nachgewiesen.

#### **2.2.10.2 Temperaturtoleranz**

Das Wachstum wurde bei verschiedenen Temperaturen (6°, 22°, 28°, 24°, 37° und 41°) getestet. Um die Inkubation bei mikroaerophilen Bedingungen zu gewährleisten, wurden die beimpften Agarplatten in Anaerobierbeutel gepackt. Die mikroaerophilen Bedingungen wurden mit Hilfe der CampyGen®Compact Beutel hergestellt. Die Inkubation erfolgte für 4 Tage außer bei der Inkubation bei 6°C, welche 3 Wochen dauerte.

### 2.2.10.3 Anaerobes Wachstum bei 37°C

Wurde im Rahmen der Kaliumtellurit/Tetrazolium Reduktion getestet.

### 2.2.10.4 Untersuchung auf Cholesterolbedarf

Als Positivkontrollen wurde *M. bovirhinis* NCTC 10118<sup>T</sup> und als Negativkontrollen *A. laidlawii* NCTC 10116<sup>T</sup> benutzt.

#### 2.2.10.4.1 Wachstum auf serumfreien Nährböden, Untersuchung des Cholesterolbedarfs

Hierzu wurden die Mykoplasmen auf serumfreien Nährböden inkubiert, welchen unterschiedliche Cholesterolmengen beigesetzt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> für 3 Tage. Im Falle dass Wachstum auftreten würde, wären die Kolonien noch drei mal auf serumfreien Nährböden zu passagieren bevor serumunabhängiges Wachstum als nachgewiesen gilt.

- Cholesterol Stocklösung

Cholesterol	20 mg
Ethanol p.A.	1 ml

- MedB ohne Serum, ohne Zusatzstoffe

Heart Infusion Broth	6,15 g
Agar	3,2 g
dH <sub>2</sub> O	225 ml
autoklavieren bei 121°C für 20min	
25%iges Hefeextrakt (w/v)	25 ml
0,2%ige Kalbsthymus DNA Lösung	3,0 ml

- MedB ohne Serum, mit 0,05% BSA, 0,05% Glucose, 10 µg/ml Palmitinsäure (Basismedium A)

Heart Infusion Broth	2 g
Agar	1,05 g
dH <sub>2</sub> O	98 ml
autoklavieren bei 121°C für 20 min	
25%iges Hefeextrakt (w/v)	8,2 ml
0,2%ige Kalbs Thymus DNA Lösung	1 ml
BSA (gelöst in 1ml dH <sub>2</sub> O)	0,05 g
Glucose (gelöst in 1ml dH <sub>2</sub> O)	0,05 g
Palmitinsäure (Sigma) (gelöst in 1ml Ethanol)	0,001 g

- MedB ohne Serum, mit 0,05% BSA, 0,05% Glucose, 10 µg/ml Palmitinsäure und 1 µg/ml Cholesterol

wie BasismediumA

Cholesterol Stocklösung	5 µl
Ethanol	995,0 µl
10%iges Tween 80	1 ml

- MedB ohne Serum, mit 0,05% BSA, 0,05% Glucose, 10 µg/ml Palmitinsäure und 5 µg/ml Cholesterol

wie BasismediumA

Cholesterol Stocklösung	25 µl
Ethanol	975 µl
10%iges Tween 80	1 ml

- MedB ohne Serum, mit 0,05% BSA, 0,05% Glucose, 10 µg/ml Palmitinsäure und 10 µg/ml Cholesterol

wie BasismediumA

Cholesterol Stocklösung	50 µl
Ethanol	950 µl
10%iges Tween 80	1 ml

- MedB ohne Serum, mit 0,05% BSA, 0,05% Glucose, 10 µg/ml Palmitinsäure und 20 µg/ml Cholesterol

wie BasismediumA

Cholesterol Stocklösung	100 µl
Ethanol	900 µl
10%iges Tween 80	1 ml

#### 2.2.10.4.2 Verhalten gegenüber Digitonin

Der Test wurde nach Clyde (1964) durchgeführt. Hierzu wurden MedB Agarplatten mit 150 µl einer flüssigen, gut angewachsenen Mykoplasmenkultur beimpft. Nachdem das Medium auf der Platte eingetrocknet war, wurde in die Mitte der Platte ein steriles Filterplättchen gelegt, welches in einer 1,5%igen Digitonin Lösung getränkt war. Das getränkte Filterplättchen musste am Vortag vorbereitet werden und über Nacht bei 37°C getrocknet werden. Trat ein Hemmhof um das Filterplättchen auf, so bestand eine Wachstumshemmung. Diese kommt dadurch zustande, dass Digitonin das in der Membran gebundene Cholesterol bindet und dabei die Mykoplasmen lysiert.

- Digitonin Lösung

Digitonin (Merck)	75 mg
Ethanol p.A.	5 ml

#### **2.2.10.5 Verwertung von Kohlenhydraten und Alkoholen**

Als Basismedium diente hier MedB ohne Glucose (MedB<sup>-Glu</sup>). Die zu untersuchenden Zucker und Alkohole wurden in einer Endkonzentration von 1% zugesetzt. (Aluotto et al., 1970, Barber u. Fabricant, 1971). Die zu untersuchenden Stämme wurden in MedB angezogen und dann 2 mal in MedB<sup>-Glu</sup> passagiert, bevor mit ihnen eine MedB<sup>-Glu</sup> Kultur beimpft wurde, welche einen der zu untersuchenden Zucker bzw. Alkohole in einer 1% Konzentration enthielt. Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 37°C. Es wurde auf Verwertung von Glucose, Lactose, Maltose, Saccharose, Galactose, Fructose, Arabinose, Sorbit, Rhamnose, Xylose, Mannit, Trehalose, Dulcit, Inositol, Esculin und Salicin untersucht. Durch die Verwertung kommt es zu einer Ansäuerung des Mediums, welche sich durch einen Farbumschlag des in dem Medium enthaltenen Phenolrot von rot nach gelb zeigt.

Als Positivkontrolle diente *M. bovirhinis* NCTC10118<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

#### **2.2.10.6 Hydrolyse von Arginin**

Als Medium diente MedB, dem Arginin in einer Endkonzentration von 0,1% und 1% zugesetzt wurde. Es tritt eine Rosafärbung ein, wenn Argininhydrolyse auftritt.

Als Positivkontrolle diente *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. bovirhinis* NCTC10118<sup>T</sup>.

#### **2.2.10.7 Hydrolyse von Harnstoff**

Als Medium diente MedB, dem Harnstoff in einer Endkonzentration von 1% zugesetzt wurde. Es tritt eine Rosafärbung ein, wenn Harnstoffhydrolyse auftritt.

Als Positivkontrolle diente *Ureaplasma diversum* NCTC10182<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

#### **2.2.10.8 Reduktion von Methylenblau**

Als Medium diente MedB, dem Methylenblau in einer Endkonzentration von 0,0025% zugesetzt wurde. Wird Methylenblau reduziert, so entfärbt sich das Medium vollständig.

Als Positivkontrolle diente *M. bovirhinis* NCTC10118<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

### 2.2.10.9 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid und Kaliumtellurit-Reduktion.

Die Reduktion erfolgte auf festen Nährböden (Aluotto et al 1970). Die in MedB angezogenen Mykoplasmen wurden mit einer Impföse auf den Nährböden im Doppelansatz ausgestrichen und dann jeweils anaerob und microaerob bei 37°C inkubiert. Wird 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid reduziert, so nehmen die Mykoplasmenkolonien eine rosa bis rote Färbung an, die sowohl mit freiem Auge als auch mit dem Stereomikroskop gut zu beobachten ist. Eine Reduktion von Kaliumtellurit führt zu einer Schwarzfärbung der Kolonien. Als Positivkontrolle diente *M. bovirhinis* NCTC10118<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

- Medium für die Tetrazolium Reduktion:

Heart Infusion Broth	9,75 g
Agar	6,0 g
dH <sub>2</sub> O	390 ml

Autoklavieren bei 121°C für 20min

Abkühlen lassen auf ca.55°C dann Zugabe von

Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	100 ml
25%igem Hefeextrakt	5,0 ml
2%iger 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid Lösung (w/v)	5,0 ml

- Medium für die Kaliumtellurit Reduktion:

Heart Infusion Broth	9,75 g
Agar	6,0 g
dH <sub>2</sub> O	390 ml

Autoklavieren bei 121°C für 20 min

Abkühlen lassen auf ca.55°C dann Zugabe von

Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	100 ml
25%igem Hefeextrakt	5,0 ml
1%iger Kaliumtellurit Lösung (w/v)	2,5 ml



### 2.2.10.10 Phosphataseaktivität

Von gut bewachsenen flüssigen Mykoplasmenkulturen wurden drei Platten zum Test auf Phosphataseaktivität beimpft. Außerdem wurde eine unbeimpfte Platte zur Kontrolle ebenfalls bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Nachweis erfolgte, indem 5 M NaOH auf die Platten getropft wurden. Die Platten wurden nach 3, 7 und 14 Tagen getestet. Wurde das in den Platten enthaltene Phenolphthalein-Diphosphat durch Phosphatase in Phenolphthalein hydrolysiert so kam es zu einer Rosafärbung durch NaOH. (Aluotto et al., 1970).

- Medium für den Phosphataseaktivitätstest:

Difco™ Herz Bouillon	10,5 g
dH <sub>2</sub> O	430 ml
pH Wert auf 7,8 einstellen	
Agar	5 g
autoklavieren bei 121°C für 20min	
abkühlen lassen auf ca. 55°C dann Zugabe von	
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	50 ml
25%igem Hefeextrakt	18,7 ml
Penicillin	½ Mega I.E.
Natriumphenolphthaleindiphosphat	5 ml

### 2.2.10.11 Hydrolyse von Gelatine

Aus einer dicht bewachsenen MedB Kultur wurde das Medium für die Gelatine Hydrolyse beimpft. Inkubation erfolgte bei 37°C für vier Wochen. Alle 7 Tage wurden die Röhrchen für 30 min auf 4°C gestellt. Es wurde kontrolliert ob das Medium flüssig bleibt. Ist das der Fall, so liegt Hydrolyse vor.

Als Positivkontrolle diente *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. bovirhinis* NCTC10118<sup>T</sup>.

- Medium für Gelatinehydrolyse:

Heart Infusion Broth	2,5 g
Gelatine (BioRad)	15 g
dH <sub>2</sub> O	97,5 ml

autoklavieren bei 121°C für 20 min

abkühlen lassen auf ca. 55°C dann Zugabe von

Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	25 ml
25%igem Hefeextrakt	1,25 ml
10%iger Thalliumacetat Lösung	125 µl
¼ Trockenampulle Penicillin	

Aliquotieren zu je 3 ml in Glasröhrchen und bei 4°C lagern.

### 2.2.10.12 Hydrolyse von Casein

Mit Hilfe der von Aluotto et al. (1970) beschriebenen Überschichtungstechnik wurde auf Hydrolyse von Casein getestet. MedB Platten wurden mit Mykoplasmen beimpft und zwei Tage inkubiert, anschließend mit caseinhaltigem Agar überschichtet. Es wurde dann bis zu 7 Tage inkubiert. Ist eine Aufhellung des Agars analog zur Positivkontrolle zu beobachten, so liegt Proteolyse des Caseins vor. Als Negativkontrolle diente *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

- Caseinhaltiger Agar

Magermilchpulver (Maresi)	8 g
dH <sub>2</sub> O	80 ml
pH auf 7,6 einstellen	

Agar	2 g
dH <sub>2</sub> O	120 ml
pH auf 7,6 einstellen	

die beiden Lösungen werden getrennt autoklaviert und danach vermengt.

### 2.2.10.13 Film/Fleckenbildung

Film und Fleckenbildung wurde von Edward (1950, 1954) beschrieben. Hierzu wurden Mykoplasmen, aus einer Flüssigkultur, auf MedB Platten in einer 1:2000 Verdünnung aufgetragen, sodass Einzelkolonien entstanden. Diese wurden dann bis zu zwei Wochen bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> inkubiert und in regelmäßigen Abstand auf die Bildung von Film und Flecken kontrolliert.

Als Positivkontrolle diente *M. gallinarum* NCTC10162<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

### 2.2.10.14 Haemadsorption

Die Adsorption von Schaferythrozyten an Mykoplasmenkolonien wurde in Anlehnung an die Methode von Del Guidice und Pavia (1964) untersucht. 5 ml Schafblut wurden dazu mit 6 ml Alsevers Puffer durch Schütteln gemischt. 1 ml dieser Mischung wurde mit 350 g für 3 min zentrifugiert und 2-mal in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und 20 µl davon in 10 ml 0,005% Methylenblau/PBS verdünnt. 5% BSA wurde zugegeben, um die Adsorption an die Mykoplasmenoberfläche zu optimieren. Etwaige störende Oberflächenproteine wurden durch Auflegen von Nitrozellulose entfernt (siehe auch Kolonieimmunoblot). Die Platten wurden mit der hergestellten Lösung für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Platten vorsichtig 3-mal mit PBS gewaschen und unter dem Stereomikroskop die Adsorption überprüft.

Als Positivkontrolle diente *M. gallisepticum* NCTC10115<sup>T</sup>, als Negativkontrolle *M. arthritidis* NCTC10120<sup>T</sup>.

- Alsevers Puffer

NaCl	210 mg
Trisodiumcitrat	400 mg
Glucose	1,025 g
dH <sub>2</sub> O	ad 50 ml
pH auf 6,1 einstellen mit 10%iger Essigsäure	

### 2.2.10.15 Hämolyse

Ob Hämolyse vorliegt oder nicht wurde auf Blutagarplatten getestet. Die Mykoplasmen wurden aus einer gut bewachsenen MedB Flüssigkultur durch pipettieren von 150 µl einer 1:1000 Verdünnung aufgetragen. Die Platten wurden für 9 Tage bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> inkubiert und regelmäßig auf Hämolyse kontrolliert.

- Blutagar

Blut Agar Basis (Oxoid CM055)	40 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml
autoklavieren	
Schafblut	50 ml

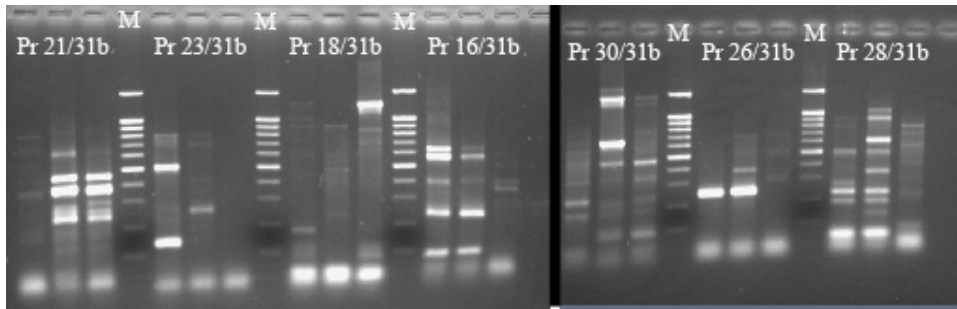
## **3 Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1 Untersuchung der genomischen Variabilität in *MmmSC***

In der vorliegenden Arbeit sollte die genomische Variabilität von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type untersucht werden. Mit den daraus erhaltenen Sequenzdaten sollten spezifische Primer konstruiert werden, um mittels PCR einzelne *MmmSC* Stämme voneinander unterscheiden zu können.

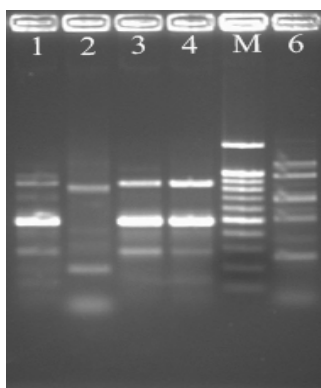
#### **3.1.1 RAPD-PCR – „Fingerprinting“**

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden mittels RAPD-PCR genomischen „Fingerprints“ erstellt, wie bereits 1990 erstmals von Welsh and Mc Clelland (1990) sowie Williams et al. (1990) beschrieben wurde. Dabei kommen keine Primerpaare zur Anwendung, sondern nur ein kurzer Primer (ca. 10 Basen lang). Durch die geringe Länge der Primer binden diese mehrmals - statistisch im Genom. Dabei werden möglichst unstringente Bedingungen für die PCR gewählt, was wiederum für ein Binden der Primer förderlich ist. Aufgrund des niedrigen G+Cmol% Verhältnisses (das Verhältnis wurde dem G+Cmol% Gehalt von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC angepasst) und der Länge der Primer kommen bei der RAPD-PCR sehr niedrige „annealing“ Temperaturen zur Anwendung. Die Sequenzen der Banden anhand welcher sich die Stämme unterscheiden lassen, sollten herangezogen werden, um spezifische Primer zu entwickeln. Hierfür wurde mit einem Set von zwei bis vier Stämmen jeder RAPD Primer in einer PCR getestet (Abb. 1) um festzustellen ob Produkte entstehen. War dies der Fall so wurde die PCR mit allen Stämmen wiederholt.



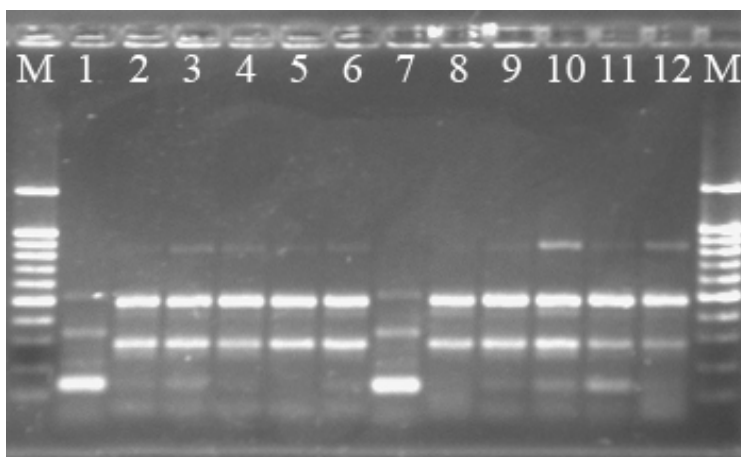
**Abb. 1:** für jede Primerkombination wurde zuerst die Negativkontrolle dann PG1<sup>T</sup> gefolgt von Afadé aufgetragen. M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).

Im Laufe der Diplomarbeit wurden alle Primer (Tab. 2) sowie Kombinationen jener Primer, bei welchen die „Annealing“ Temperatur um nicht mehr als 3°C variiert benutzt. Bei der Untersuchung der Stämme mit dieser Methode zeigte sich deutlich, dass die Negativkontrolle, d.h. jener PCR Ansatz, in welchem ohne Zugabe von DNA die PCR durchgeführt wurde, in beinahe allen Fällen Banden zeigte. Diese Banden lassen sich nicht vermeiden und beruhen nicht auf Kontaminationen der PCR Ansätze, sondern vermutlich auf Resten an DNA welche in dem Polymerase Mix enthalten sind. Hinzu kommt die geringe Stringenz, welche bei der RAPD-PCR zur Anwendung kommt. Bei einer RAPD-PCR muss also immer eine Negativkontrolle mitlaufen, um signifikante Banden identifizieren zu können die dann nicht für sequenzspezifische Untersuchungen berücksichtigt werden. Wie in Abb. 2 zu sehen ist sind diese Banden nicht in allen Proben vorhanden, obwohl sie in der Nullkontrolle zu sehen sind. Andererseits gibt es auch „Fingerprints“ in welchen alle vorhandenen Banden auch in der Nullkontrolle vorhanden waren.



**Abb. 2:** Genomischer „Fingerprint“ nach RAPD PCR mit Primer 22; 1: KH3J, 2: PG1<sup>T</sup>, 3: Mara, 4: Asmara, 6: Negativkontrolle, M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).

Weiters zeigten die zehn untersuchten Stämme ein äußerst homogenes Bandenmuster (Abb. 3). Trotz allem zeigten mehrere Stämme „Fingerprints“ mit charakteristischen Banden (Abb. 4). Besonders die Stämme Mara und Asmara zeigten in mehreren „Fingerprints“ Banden, welche sie von den anderen untersuchten Stämmen differenzierte (Abb. 4). Eine auffallende genomische Gemeinsamkeit dieser zwei Stämme ist allerdings schon bekannt (persönliche Mitteilung Joachim Frey). Wenn in einem PCR Ansatz für einen Stamm ein spezifischer „Fingerprint“ erhalten wurde, wurde in einem größerem Volumen (100µl statt 25µl) die PCR wiederholt und aus diesem die spezifische Bande extrahiert. Allerdings zeigte sich hier, dass die Reproduktionsfähigkeit von RAPD-PCR teils sehr eingeschränkt ist. Trotz Verwendung desselben Thermocyclers, Mastermixe und derselben DNA konnten manche Ergebnisse nicht reproduziert werden. Banden, welche im ersten „Fingerprint“ als spezifisch identifiziert wurden, waren in einem weiteren „Fingerprint“ unspezifisch.



**Abb. 3: Genomischer „Fingerprint“ nach RAPD-PCR mit Primer 22; 1 und 7: Negativkontrolle, 2: 8740, 3: PO1960, 4: T1/44, 5: Afadé, 6: Mara, 8: 0526, 9: PG1<sup>T</sup>, 10: KH3J, 11: Asmara, 12: 4370. M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).**

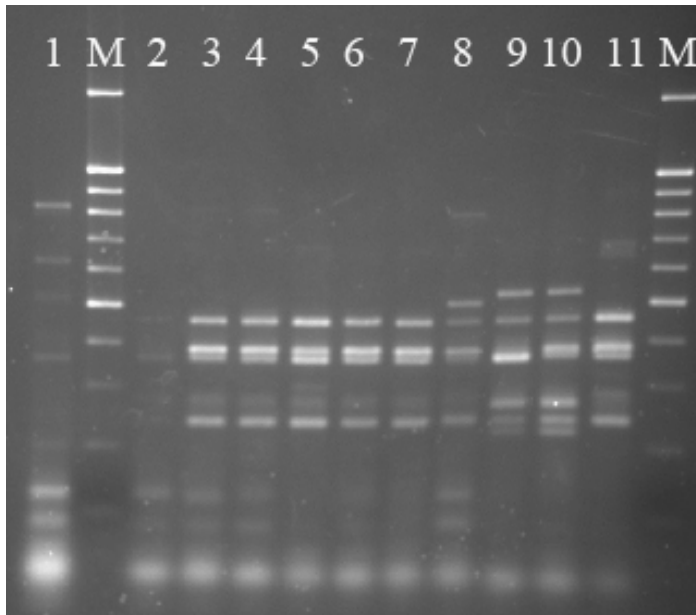


Abb. 4: Genomischer „Fingerprint“ nach RAPD-PCR mit den Primern 21/31b; 1: Negativkontrolle, 2: 0526, 3: PO1960, 4: T1/44, 5: Afadé, 6: 8740, 7: 4370, 8: KH3J, 9: Asmara, 10: Mara, 11: PG1<sup>T</sup>. M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).

Figxx

### 3.1.1.1 Spezifische Bande 133/2: Mara 1

Nach RAPD-PCR mit dem Primer 20 wurde eine spezifische Bande für den Stamm Mara entdeckt (Abb. 6). Diese wurde eluiert und nach erfolgter Klonierung in einem Plasmid sequenziert. Basierend auf der Sequenz konnte so das spezifische Primerpaar Maral konstruiert werden (133/2F und 133/2R). Erstaunlicherweise zeigte diese Sequenz nur 57,3% Übereinstimmung zu *MmmSC* PG1<sup>T</sup>, aber 73,9% zu einem Sequenzabschnitt in *Mycoplasma agalactiae*.

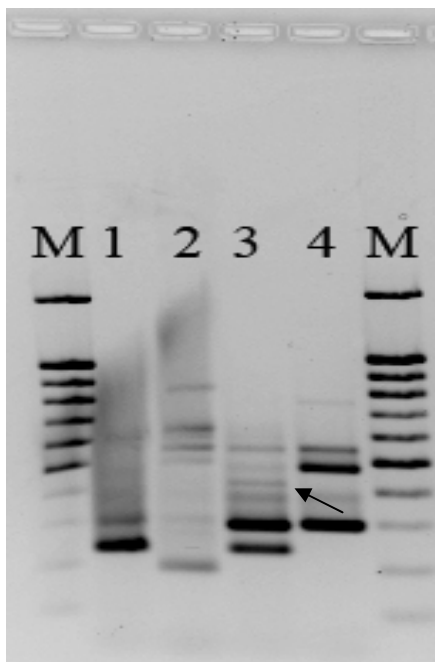
Das spezifische Primerpaar wurde so konstruiert, dass Produkte in der PCR eine Größe von 250 Bp haben sollten und eine möglichst hohe Annealingtemperatur möglich war. Weiters durfte die Sequenz nicht mehrmals im Genom von *MmmSC* zu finden sein. Bei Verwendung dieses Primerpaares in einer PCR zeigte sich anfänglich, dass bei allen Stämmen eine schwache Bande vorhanden war. Ein sehr starkes Signal wurde bei den Stämmen Mara und Asmara beobachtet. Nach Erhöhung der MgCl<sub>2</sub> Konzentration traten die schwachen Banden nicht mehr auf, während die Bande bei Mara und Asmara erhalten blieb (Abb. 5).



Somit konnte gezeigt werden, dass Mara und Asmara einen Sequenzbereich gemein haben, welcher sie von den anderen *MmmSC* Stämmen mit Hilfe des Primerpaares Mara1 (133/2F und 133/2R) unterscheidbar macht.



**Abb. 5:** PCR mit Primer Mara1; 1: Negativkontrolle, 2: O526, 3: Afade, 4: KH3J, 5: 4370, 6: T1/44, 7: 8740, 8: PO1960, 9: Asmara, 10: PG1<sup>T</sup>, 11: Mara, M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).



**Abb. 6:** Genomischer „Fingerprint“ nach RAPD-PCR mit Primer 20; 1: Asmara, 2: Negativkontrolle, 3: Mara, 4: Afadé, M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).; der Pfeil markiert die Bande welche eluiert wurde.

### 3.1.1.2 spezifische Bande 232/2: Asmara1

Der nach PCR mit dem Primerpaar 19/25 erhaltene „Fingerprint“ zeigte eine spezifische Bande für den Stamm Asmara. Die Sequenz dieser Bande zeigte 87,8% Identität zu einem Genomabschnitt von *M. agalactia*, jedoch keine Übereinstimmung im Genom von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Das auf der Basis dieser Sequenz konstruierte Primerpaar Asmara1 (232/2F und 232/2R ) lieferte in der PCR das erwartete Produkt in der Größe von 230 Bp für den Stamm Asmara, aber auch für den Stamm Mara ein Produkt identischer Größe (Abb. 7). Somit war ein weiteres Primerpaar vorhanden, welches Mara und Asmara von den anderen untersuchten Stämmen differenziert.

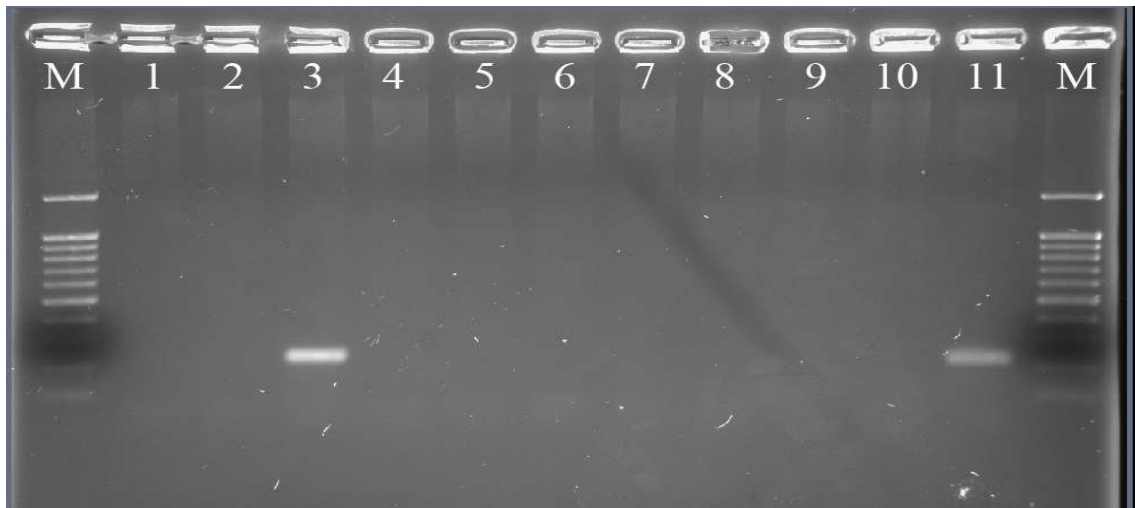


Abb. 7: PCR mit dem Primerpaar Asmara1; 1: Negativkontrolle, 2: 8740, 3: Asmara, 4: 0526, 5: KH3J, 6: PG1<sup>T</sup>, 7: T1/44, 8: PO1960, 9: Afadé, 10: 4370, 11: Mara, M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).

### 3.1.1.3 Weitere eluierte spezifische Banden und daraus konstruierte Primer

Weitere Primerpaare (106/3F-R, 133/7F-R, 164/2F-R, 186/5F-R und 200/5F-R) wurden auf der Basis von anderen spezifischen Banden und deren Basensequenzen konstruiert. Bei Einsatz in PCRs ergaben diese Primerpaare nicht die gewünschten Ergebnisse, nämlich die Identifizierung von weiteren *Mmm*SC Stämmen. Entweder zeigten alle Stämme die als spezifisch angenommene Bande (186/5F-R; 164/2F-R) oder in keinem der Stämme wurde nach der jeweiligen PCR das erwartete Produkt nachgewiesen (106/3F-R; 200/5F-R).

### 3.1.2 DGGE

Mit Hilfe der Denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) ist es möglich Fragmente gleicher Länge aufgrund von Sequenzen differenzieren zu können (Fisher and Lerman, 1982; Zambon et al., 2005). Um Sequenzunterschiede in den Genomen der zur Verfügung stehenden *MmmSC* Stämme zu finden wurden die Primerpaare DGGE 1 und 2 nach einem virtuellen Vergleich von *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC und *Mycoplasma capricolum subsp capricolum* California kid ATCC 27343 konstruiert. Primerpaar DGGE1 führt zu einem 462Bp großem Produkt, durch Amplifikation des 5' 877929 bis 3' 878391 Bereichs des *MmmSC* Genoms, DGG2 zu einem 450Bp großem Produkt, durch Amplifikation des 5' 155983 bis 3' 156435 Bereichs *MmmSC* Genoms. Nach erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte identischer Länge im denaturierenden Gradientengel aufgetrennt (Abb. 8). Bei den untersuchten Sequenzbereichen konnte kein Unterschied, weder bei den Produkten des Primerpaares DGGE1 noch bei Produkten des Primerpaares DGGE2, zwischen der Wanderungsdistanz der PCR-Produkte der einzelnen Stämme festgestellt werden.

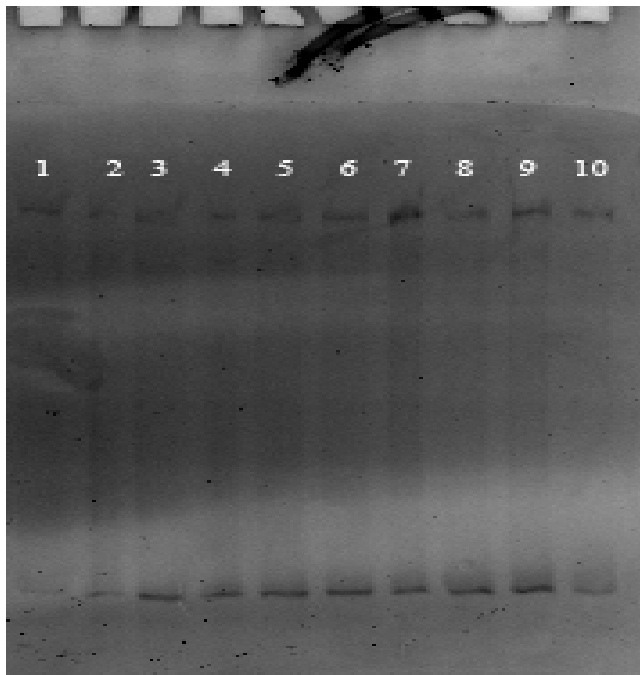


Abb. 8: DGGE nach PCR mit Primerpaar DGGE 2, Gel mit einem denaturierenden Gradienten von 30% nach 80%, 60°C, 90V, 15h, 1:4378, 2: PG1<sup>T</sup>, 3: 8740, 4: KH3J, 5: PO1960, 6: Mara, 7: Afadé, 8: Asmara, 9: T1/44, 10: O526.

### 3.1.3 Untersuchungen der Stämme beruhend auf Publikationen

#### 3.1.3.1 Nachweis des „housekeeping gens“ FusA im *Mycoplasma mycoides* Cluster

In der Arbeit von Lucía Manson-Silvn et al. (2007) wurden die Arten des *Mycoplasma mycoides* Cluster (Cottew et al. 1987) untersucht. 16Sr RNA Gensequenzanalysen zeigen (Pettersen et al., 1996), dass innerhalb des *Mycoplasma mycoides* Clusters die Unterschiede nur sehr gering sind (nur 36 variable Positionen auf 1467 Nukleotide der sequenzierten 16S rRNA Operons). Daher erscheint ein Stammbaum basierend auf der Sequenz von 16S rRNA für die Arten des Mykoides Cluster wenig verlässlich zu sein. Aus diesem Grund wurden in der Arbeit von Manson-Silvn fünf „housekeeping genes“ identifiziert und anhand deren Sequenzen ein Stammbaum berechnet. Wir benutzten ein Primerpaar (FusA F & FusA R) aus der genannten Arbeit, um den Versuch mit allen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC Stämmen, welche uns zur Verfügung standen, zu wiederholen. Bei allen Stämmen ist das für das Mkcoides Cluster spezifische PCR-Produkt zu sehen (Abb. 9).

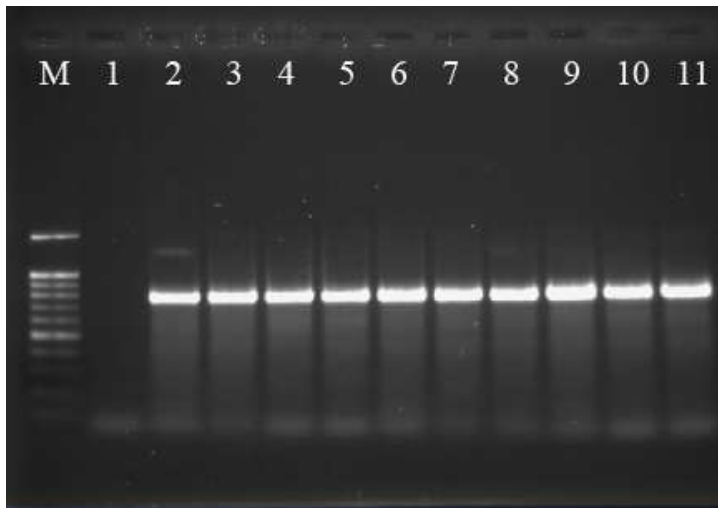


Abb. 9: PCR mit dem Primerpaar FusA; 1: Negativkontrolle, 2: 4378, 3: Asmara, 4: KH3J, 5: T1/44, 6: 8740, 7: Mara, 8: Afad, 9: PG1, 10: O526, 11: PO1960, M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).

### 3.1.3.2 Spezifische Bande für Stamm PG1<sup>T</sup>

Bischof et al. (2006) gelang es aufgrund von Unterschieden im Genom von PG1<sup>T</sup> zu anderen Stämmen von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, ein spezifisches Primerpaar zu konstruieren, welches den Typstamm von allen anderen Stämmen unterscheidet. Dieser Versuch wurde im Rahmen der Diplomarbeit wiederholt. Dabei wurde auch eine DNA untersucht, welche zwar als PG1<sup>T</sup> beschriftet war, bei welcher wir aber vermuteten, dass es sich dabei um einen anderen Stamm von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC handelt. Tatsächlich konnte diese als nicht PG1<sup>T</sup> identifiziert werden, da sie kein Produkt mit den PG1<sup>T</sup> spezifischen Primern lieferte (Abb. 10). Es wurde gezeigt, dass mit dem Primerpaar (*MmmSC\_23760fwd*, *MmmSC\_1rev*) eine Identifizierung von PG1<sup>T</sup> durch Entstehung eines Produkts möglich ist. Da die ursprünglich eingesetzte Menge an DNA nur eine sehr schwache Bande des zu erwartenden Produkts lieferte, wurde ein PCR-Ansatz mit unterschiedlichen DNA Mengen gemacht (Fig. 10).

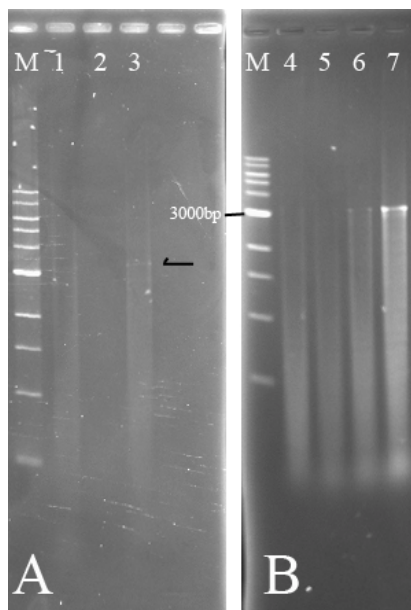
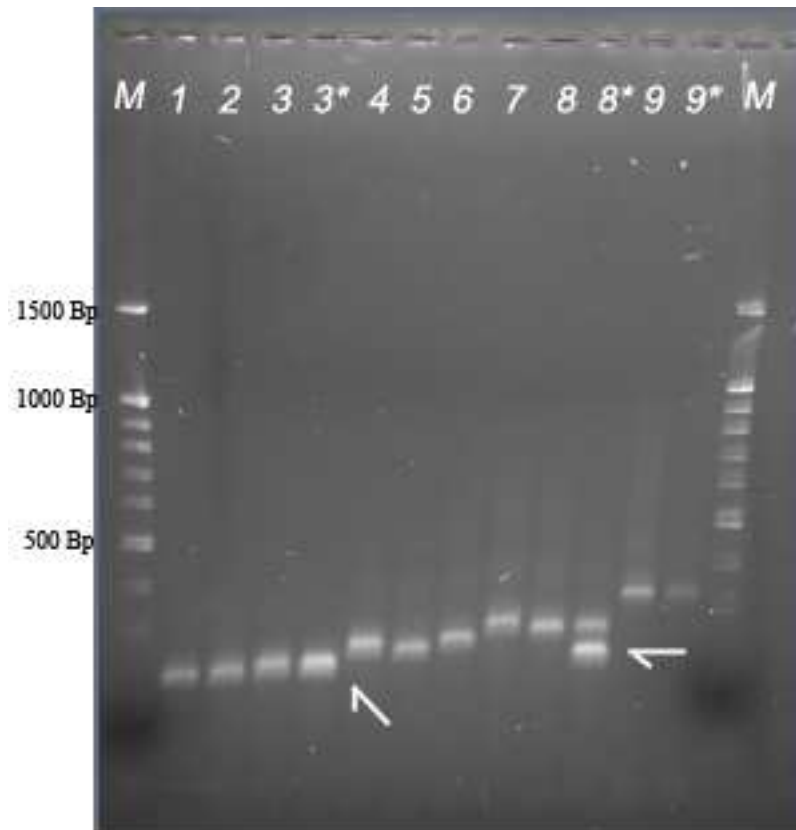


Abb. 10: PCR mit Primer *MmmSC\_23760fwd* und *MmmSC\_1rev*; 1%iges Agarosegel; A) 1: PG1<sup>T</sup> (Kontaminante), 2: Afadé, 3: PG1<sup>T</sup>, nur ganz schwaches Produkt durch Pfeil ausgewiesen. B) PG1<sup>T</sup> mit steigender Menge an eingesetztem Template (4: 0,5µl, 5: 1µl, 6: 1,5µl, 7: 2µl). Als Längenmarker M diente Quick load 1kb DNA ladder (biolabs)

### **3.1.3.3 Unterscheidung der Stämme von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC mit Hilfe von various number tandem repeats (VNTR)**

VNTRs sind repetitive DNA-Sequenzen. Die Kopienzahl kann dabei zwischen Stämmen einer Art variieren und wird für evolutionäre Untersuchungen herangezogen (van Belkum et al., 1998). Es ist möglich mit Hilfe von VNTRs zwischen Stämmen einer Art zu unterscheiden. Dies wurde für eine Reihe von Bakterien, wie etwa *Staphylococcus aureus* (Sabat et al., 2003) *Mycobacterium tuberculosis* (Frothinha & Meeker- O'Connel, 1998), *Borrelia* spp. (Farlow et al., 2002), *Leptospira* spp. (Slack et al., 2005), *Brucella* spp. (Whatmore et al., 2006), *Francisella tularensis* (Farlow et al., 2001), *Legionella pneumophila* (Pourcel et al., 2003) gezeigt. McAuliffe et al. (2007) gelang dies erstmals für *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. Die Autoren untersuchten die Genomsequenz von PG1<sup>T</sup> auf das Vorkommen von VNTRs. Mit diesen Daten gelang es drei zwischen den Stämmen von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC differenzierende Primerpaare zu konstruieren. VNTR4 teilte die untersuchten Stämme in acht Gruppen, basierend auf der Länge des PCR Produkts. VNTR5 differenzierte Stamm Afadé von allen anderen, und VNTR42 unterschied europäische von afrikanischen Stämmen durch das Fehlen des Produkts bei den europäischen Stämmen. Nur vier (PG1<sup>T</sup>, Afadé, T1/44 und KH3J) der für die Arbeit zur Verfügung stehenden Stämme waren mit denen von McAuliffe identisch.

In der Arbeit wurde auch gezeigt, dass Primerpaar VNTR4 in der PCR das größte Auflösungspotential besitzt und auch Asmara und Mara unterscheidet (Abb. 11), was uns bisher nicht gelungen war. Des weiteren wurden, wie in Abb. 11 dargestellt, die VNTR4 Primer in Kombination mit dem Primerpaar Mara 1 eingesetzt.



**Abb. 11: PCR mit Primerpaar VNTR4: 1: Afadé, 2: O526, 3: Asmara, 4: Asmara mit 133/2 Bande, 5: PG1, 6: T1/44, 7: PO1960, 8: 4378, 9: Mara, 10: Mara mit 133/2 Bande, 11: KH3J, 12: KH3J mit 133/2 Bande. Pfeile zeigen die Mara1 (133/2) Banden. M: 100Bp Längenmarker (100Bp - 1000Bp) mit zusätzlicher Bande bei 1500Bp (Bioron).**

Auf Abb. 11 sind sechs verschieden große Produkte des Primerpaares VNTR4 zu erkennen. Die Stämme Afadé, O526 und Asmara bilden ein Produkt welches 236 Bp repetitive Sequenzen enthält. Den Autoren zufolge müsste Stamm T1/44 ebenfalls ein Produkt dieser Größe liefern. Wir sehen hier aber ein Produkt welches größer ist. Allerdings kleiner als das nächst große, beschriebene Produkt, welches Stamm PG1<sup>T</sup>, Stamm 8740 (nicht abgebildet) sowie Stamm PO1967 zeigen. Dieses besteht aus 250 Bp repetitiven Sequenzen. Stamm Mara zeigt ein Produkt mit 260 Bp wiederholenden Sequenzbereichen. Stamm 4370 zeigt ein Produkt größer als das beschriebene Produkt von Stamm Mara. Dieses wurde in der Publikation nicht beschrieben. Stamm KH3J zeigt ein Produkt, welches 290 Bp repetitive Sequenzen enthält.

Wir konnten somit durch die VNTR4-PCR wie schon von den Autoren gezeigt Stämme von *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC teilweise differenzieren, hier in sechs

Gruppen. Dabei erhielten wir allerdings zwei bisher noch nicht beschriebene Produktgrößen.

Durch den zusätzlichen Einsatz des Primerpaares Mara1 kann man in einer Duplex-PCR den Stamm Asmara weiter differenzieren. Durch das zusätzliche Produkt erhält man eine deutlich stärkere Bande als bei den Stämmen Afadé und 0526 (Abb. 11). Die Produkte der Primerpaare VNTR4 und Mara1 lassen sich hier nicht unterscheiden. Eine Lösung hierfür wäre es die Primer VNTR4f nach 5' oder VNTR4r nach 3' im Genom zu verschieben, sodass es zu größeren Produkten kommt.



## **3.2 Beschreibung der neuen Arten *Mycoplasma struthionis* sp.nov. und *Mycoplasma nasistruthionis* sp.nov.**

### **3.2.1 Beschreibung von *Mycoplasma struthionis* sp. nov.**

*Mycoplasma struthionis* sp. nov. (stru. thi. o'nis. L. gen. N. struthionis, vom Strauss – da die Stämme der Art aus der Lunge eines Strauss isoliert wurden).

Zellen können einen 0.22µm Filter passieren. Typische spiegeleiförmige Kolonien sichtbar auf Agar unter dem Stereomikroskop nach 48h Inkubation bei 37°C in 7%CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Nicht helical und nicht motil. Wachstum beobachtet bei 34-37°C. Chemoorganotroph. Benötigt Serum oder Cholesterol für Wachstum. Keine Säureproduktion aus Zucker. Hydrolysiert Arginin aber nicht Harnstoff. Reduziert Kalliumtellurit. Haemadsorption von Schaferythrozyten. Polare Lipide Profil: Hauptkomponenten: 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acyl-glycero-3-Phosphocholine, unbekanntes Phospholipid PL2, das unbekannte Aminophospholipid AL1 und Phosphatidylglycerol. Moderate Mengen des unbekannten Glycolipids GL3 und Phosphatidylethanol. Geringe Mengen des unbekannten Lipids L2, L3, der unbekannten Glycolipide GL4, GL5, GL6 und GL7, Phosphatidylethanolamin, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-Phosphocholine und phosphocholine-6'-α-glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-Glycerol.

Serologisch sowie mit Hilfe der 16S rRNA Gensequenz unterscheidbar von anderen *Mycoplasma* Spezies. Der Typstamm ist 237IA<sup>T</sup>.

### **3.2.2 Beschreibung von *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov.**

*Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. (na. si. Stru. thi. o'nis. L.. nasus –I, Nase, L. n. struthio – onis, Strauss; N.L. gen. n. nasistruthionis, aus der Nase eines Strauss)

Zellen können einen 0.22µm Filter passieren. Typische spiegeleiförmige Kolonien sichtbar auf dem Agar unter dem Stereomikroskop nach 48h Inkubation bei 37°C in 7%CO<sub>2</sub> Atmosphäre. Nicht helical und nicht motil. Zellen bilden Aggregate. Wachstum beobachtet bei 28-37°C. Chemo-organotroph. Benötigt Serum oder

Cholesterol für Wachstum. Hydrolysiert weder Harnstoff noch Arginin. Säureproduktion aus Glukose. Reduziert Methylenblau und Kalliumtellurit unter anaeroben Bedingungen. Haemadsorption von Schaferythrozyten. Polare Lipide Profil: Hauptkomponenten: Diphosphatidylglycerol, 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acylglycero-3-Phosphocholin, unbekanntes Phospholipid PL2 und das unbekannte Aminophospholipid AL1. Moderate Mengen vom unbekannten Phospholipid PL1, unbekannten Glycolipid GL3 und Phosphatidylglycerol. Geringe Mengen der unbekannten Lipide L1, L2, unbekannten Glycolipide GL1, GL2, Phosphatidylethanolamin, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-Phosphocholin und phosphocholine-6'- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-Glycerol. Anhand der polaren Lipide unterscheidbar von den nächsten Verwandten. Serologisch sowie mit Hilfe der 16S rRNA Gensequenz unterscheidbar von anderen Mycoplasma Spezies. Der Typstamm ist 2FIA<sup>T</sup>.

## **4 Literaturverzeichnis:**

**Aloutto, B. B., Wittler, R. G., Williams, C.O. & Faber, J. E. (1970).** Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species. *Int J Syst Bacteriol* **20**. 35-38.

**Altenburger, P., Kämpfer, P., Makristathis, A., Lubitz, W., Busse, H.-J. (1996).** Classification of bacteria isolated from a medieval wall painting. *J Biotechnol*. **47**. 39-52.

**Anderson, A. S., Rilfons, L., Bergqvist, M., Persson, S., Lidblom, G. (1996).** New aspects on membran lipid regulation in *Acheoplasma laidlawii* and phase equilibria of monoacyldiclusosyldiacylglycerol. *Biochemistry* **35**. 11119-11130.

APHIS: Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) part of the US Department of Agriculture (USDA) <http://www.aphis.usda.gov>

**Barber, T. L., Fabricant, J. (1971).** Identification of Mycoplasmatales: Characterisation Procedures. *Syst Appl Microbiol* **21**. 600-605.

**Bischof, D. F., Vilei, E. M., Frey, J. (2007).** Genomic differences between type strain PG1 and field strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. *Genomics* **88(5)**: 633–641.

**Blancou, J. (1996).** Early methods of surveillance and control for contagious bovine pleuropneumonia. *Rev sci tech Off Int Epiz* **15 (4)**. 1263-1282.

**Borst, P. (1991).** Molecular genetics of antigenic variation. *Immunol Today* **12**. 29-33.

**Bove, J. M. (1993).** Molecular features of Mollicutes. *Clin Infect Dis Suppl* **17**. 29-33.

**Bredt, W. (1988).** Mikroorganismen ohne Zellwand (Mollicutes). In: Brandis, H., Pulverer, G. (Hrsg.): *Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie*, **6. Auflage**, VerlagFischer, Stuttgart New York 526-530.

**Cassel, G. H. (1982).** Derrick Edward Award Lecture. The pathogenic potential of mycoplasmas: *Mycoplasma pulmonis* as a model. *Rev Infect Dis Suppl* **4**. 18-34.

**Cassel, G. H., Davis, J. K., Wilborn, W. H., Wise, K. S. (1978).** Pathobiology of mycoplasmas. In: Schlessinger, D. (Hrsg.): *The mycoplasmas. Vol II*. Human and animal mycoplasmas. *Academic Press, New York, San Francisco*. 235-274.

**Citti, C., Rosengarten, R. (1997).** Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. *Wien Klin Wochenschau* **109**. 562-568.

**Clyde, W. A. (1964).** Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J Immunol* **92**. 958-965.

**Cottew, G. S., Breard, A., DaMassa, A. J., Ernø, H., Leach, R. H., Lefevre, P. C., Rodwell, A. W. & Smith, G. R. (1987).** Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Isr J Med Sci* **23**. 632-635.

**Dallmann, C. (1996).** Untersuchung zur Antigenvariation von *Mycoplasma pulmonis* in der Ratte. *Diss Tierärztl Hochsch, Hannover*.

**Del Giudice, R. A., Pavia, R. (1963).** Hemadsorption by *Mycoplasma pneumoniae* and its inhibition with sera from patients with atypical pneumonia. *Bacteriol Proc* p. 71.

**Edward, D. G. (1950).** An investigation of the biological properties of organisms of the pleuropneumonia group, with suggestions regarding the identification of strains. *J Gen Microbiol* **4**. 311-329.

**Edward, D. G. (1954).** The pleuropneumonia group of organisms: A review together with some new observations. *J Gen Microbiol* **10**. 27-64.

**Farlow J, Postic D, Smith KL, Jay Z, Baranton G & Keim P (2002).** Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* **40**. 4612–4618.

**Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M & Keim P (2001).** *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* **39**. 3186–3192.

**Fischer, S. G., Lerman, L. S. (1982).** DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**. 1579-1583

**Freundt, E. A. (1974).** Present status of the medical importance of mycoplasmas. *Pathol Microbiol* **40**. 155-187.

**Frothingham R & Meeker-O'Connell WA (1998).** Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* **144**. 1189–1196.

**Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R. M. (1998).** Medizinische Mikrobiologie. Verstehen – Lernen – Nachfragen. **9.** Auflage. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York*. 343-344.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**. 680-1132.

**Manso-Silván, L., Perrier, X., Thiaucourt, F. (2007).** Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**. 2247-2258

**Masiga, W. N., Domenech, J. Windsor, R. S. (1996).** Manifestation and epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev sci tech Off Int Epiz* **15** (4). 1283-1308.

**McAuliffe, L., Ayling, R. D., Nicholas, R.A.J. (2007).** Identification and characterisation of variable- number tandem- repeat markers for the molecular epidemiological analyses of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol Lett.* **276**. 181-188.

**Mesbah, M., Premachandran, U., Whitman, W. (1989).** Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acids by high performance liquid chromatography. *Int Syst Bacteriol* **39**. 159-167

**Miles, R. J. (1992).** Catabolism in mollicutes. *J Gen Microbiol.* **138**. 1773-1783.

O.I.E.; Office International des Epizooties. <http://www.oie.int>

**Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bölske, G., Uhlén, M. & Johansson, K.-E. (1996).** Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J Bacteriol* **178**. 4131–4142.

**Pitcher, D. G., Saunders, N. A. and Owen, R. J. (1989).** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology* **8**. 151-156.

**Pourcel C, Vidgop Y, Ramisse F, Vergnaud G & Tram C (2003).** Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Legionella pneumophila* and its use for genotyping. *J Clin Microbiol* **41**. 1819–1826

**Razin, S. (1981).** Mycoplasmas: the smallest pathogenic prokaryotes. *Isr J Med Sci* **17**. 510-515.

**Razin, S. (1985).** Mycoplasma adherence. In: *Razin, S., Barile, M. F. (Hrsg.): The mycoplasmas. Vol. IV. Mycoplasma pathogenicity. Academic Press, Orlando, San Diego* 161-202.

**Razine, S. (1992).** Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self replicating prokaryotes. *FEMS Microbial Lett* **79**. 423-431.

**Razin, S., Freund, E. A. (1984).** The mycoplasmas (Section 10). In: *Krieg, N.R., Holt, J. G. (Hrsg.): Bergy's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, London Vol. I.* 740-793.

**Razin, S. Jacobs, E. (1992).** Mycoplasma adhesion. *J Gen Microbiol* **138**. 407-422.

**Razine, S., Yogev, D., Naot, Y. (1998).** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mo Biol Rev* **62**. 1094-1156.

**Richards, G. M. (1974).** Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal Biochem* **57**. 369-76

**Rosengarten, R., Yogev, D. (1996).** Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: Implication for species identification and strain standardization. *J Clin Microbiol* **34**.149-158.

**Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, Filipek R, Kosowska K, Hryniewicz W, Travis J & Potempa J (2003).** New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J Clin Microbiol* **41**. 1801–1804.

**Simecka, J. W., Davis, J. K., Davidson, M. K., Ross, S. E., Stadtländer, C. T. K.-H., Cassel, G. H. (1992).** Mycoplasma diseases of animals. In *Maniloff, J., McElhaney, R. N., Finch, L. R., Baseman, J. B. (Hrsg.): Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington D. C.* 391-415.

- Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML & Smythe LD (2005).** Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **30**. 4–10.
- Spergser, J. and Rosengarten, R. (2007).** Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S–23S rDNA PCR-RFLP. *Vet Med* **125**. 170-174.
- Tang, J; Hu, M.; Lee, S. and R. Roblin (2000).** A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture, *J Microbiol Methods* **39**. 121–126.
- Tindall, B. J. (1990).** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovororum* from various sources. *Syst Appl Microbiol* **13**. 128-130.
- Tully, J. G. (1983).** Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. *Methods Mycoplasmol* **1**. 355-362.
- Tully, J. G., Bove, J. M., Laigret, F., Whitcomb, R. F. (1993).** Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of monophyletic cluster of arthropod associated *Mollicutes* to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. Nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended description of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *Int J Sys Bacteriol* **43**. 378-385.
- Tyron, V. V., Baseman, J. B. (1992).** Pathogenic determinants and mechanisms. In *Maniloff, J., McElhaney, R. N., Finch, L. R., Baseman, J. B. (Hrsg.): Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington D. C.* 457-471



**van Belkum A, Scherer S, van Alphen L & Verbrugh H (1998).** Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**. 275–293.

**Welsh, J. and McClelland, M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**. 7213-8.

**Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, Cutler SJ & MacMillan AP (2006).** Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* **44**. 1982–1993.

**Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**. 6531-5.

**Winter, D. (2004).** Molekulare Typisierungsverfahren und Infektionsepidemiologie von Mykoplasmen in gefährdeten Wildvogelpopulationen. *Diplarbeit*, VU Wien.

**Worliczek, H. L., Kämpfer, P., Rosengarten, R., Tindall, B. J., Busse, H-J. (2007).** Polar Lipid and fatty acid profiles – Re-vitalizing old approaches as a modern tool for the classification of mycoplasmas. *Syst Appl Microbiol* **30**. 355-370.



## 5.1 Resümee der Untersuchungen bezüglich der genomischen Heterogenität von *MmmSC*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zehn Stämme der Art *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC vergleichend auf die genomischen Polymorphismen untersucht, um basierend darauf gegebenenfalls spezifische PCRs zum Nachweis einzelner Stämme zu entwickeln. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC Stämme nur geringe genomische Heterogenität aufwiesen. Es gelang zwei spezifische Primer zu designen, welche jeweils spezifisch für die Stämme Mara und Asmara waren. Diese konnten in Kombination mit bereits vorhandenen diskriminierenden Primern (VNTR4) eingesetzt werden. Somit könnte der Stamm Mara sowie Asmara von anderen Stämmen, welche dasselbe VNTR4 Produkt liefern, unterschieden werden. Es wäre von Vorteil ein größeres Set an Stämmen zur Verfügung zu haben, um diese auf Unterschiede zu untersuchen. Dies ist mittels RAPD-PCR möglich. Allerdings zeigte die Arbeit auch, dass RAPD-PCR manchmal für stammspezifische Produkte falsch positive Ergebnisse lieferte. Mehrmals ließ sich ein solches stammspezifisches Produkt nicht mehr reproduzieren bzw. erschien es in Folge nach PCR auch bei anderen Stämmen.

Mit Hilfe der DGGE ist es zwar möglich geringe Sequenzunterschiede in Fragmenten gleicher Länge zu detektieren, allerdings ist es methodisch einfacher RAPD-PCR „Fingerprints“ zu erstellen und die Bandenmuster der Stämme zu vergleichen. Momentan liegt nur das Genom vom Stamm PG1<sup>T</sup> sequenziert vor. Sollte in Zukunft das Genom eines weiteren *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC Stamm vorliegen scheint eine Untersuchung mittels DGGE vielversprechend. Wir konnten nur einen Sequenzvergleich mit der nächstverwandten Art durchführen und anhand der so erlangten Daten Primer konstruieren. Dies führte zu nicht-unterscheidbaren Produkten, somit konzentrierten wir uns auf die RAPD-„Fingerprints“ und deren Ergebnisse. Es wäre weiters möglich unspezifische RAPD Produkte mittels DGGE zu untersuchen. Es wäre durchaus möglich, dass RAPD-Produkte gleicher Länge Sequenzvariation zeigen.

Es wäre wünschenswert weitere stammspezifische Primer für *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC zu entwickeln. Diese können dann aufbauend auf anderen Arbeiten in Kombination mit bereits vorhandenen Primern eingesetzt werden. Als Beispiel sei abermals die Arbeit von McAuliffe (2007) genannt, in welcher bereits einige Stämme unterschieden werden können. Für jene bei denen dies bislang nicht möglich ist, würde die Kombination mit spezifischen Primern zur Unterscheidung ausreichen. Ebenso die Kombination mit weiteren Primern, welche die Stämme in Gruppen unterteilen bzw. für mehrere Stämme spezifisch sind, wie z.B. die Mara 1 und Asmara 1 Primerpaare. In Kombination könnte man Stämme aufgrund ihrer Bandenmuster in einer Multiplex PCR identifizieren.

## **5.2 *Mycoplasma struthionis* sp. nov and *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. from Ostrich (*Struthio camelus*) with respiratory tract disease**

Beschreibung der neuen Arten *Mycoplasma struthionis* sp.nov. und *Mycoplasma nasistruthionis* sp.nov. durch Langer et al.

Zehn mycoplasma Stämme wurden aus afrikanischen Sträußen isoliert, welche eine Erkrankung des Respirationstraktes zeigten. Die Isolation erfolgte aus zehn Individuen auf fünf verschiedenen Farmen in Namibia. Für die Isolation wurden Konditionen benutzt spezifisch für Mykoplasmen. Genomische „Fingerprints“, welche mit RAPD-PCR erstellt wurden, teilen die Stämme deutlich in zwei Cluster auf. Ein Cluster enthält sechs Stämme welche aus dem unteren Respirationstrakt (LRT) isoliert wurden. Die vier anderen Stämme wurden aus dem oberen Respirationstrakt (URT) isoliert. Der Repräsentanten des URT- Clusters, 237IA<sup>T</sup>, zeigte höchste Übereinstimmung zu *Mycoplasma spumans* PG13<sup>T</sup> (97,3%), *Mycoplasma equirhinis* M432/72<sup>T</sup> (96,8%) und *Mycoplasma falconis* H/T1<sup>T</sup> (96,0%) in der 16S rRNA Gensequenz. DNA-DNA Hybridisierung zeigte das Stamm 237IA<sup>T</sup>, auf Speziesebene, nicht mit *M. spumans* verwandt ist. Der Repräsentant des URT- Clusters, 2FIA<sup>T</sup>, zeigte höchste Übereinstimmung zu *Mycoplasma glycyphilum* 486<sup>T</sup> (95,0%) und *Mycoplasma*

*verecundum* GIH (94,6%) in der 16S rRNA Gensequenz. Die Cluster sind mithilfe serologischer Methoden sowie 16-23S rDNA PCR-RFLP von ihren nächsten Verwandten unterscheidbar. Die Analysen der polaren Lipid Muster bestätigen diese Ergebnisse und sind ebenfalls nützlich für die Differenzierung der Isolate zu ihren nächsten Verwandten. Aufgrund der in den Untersuchungen erhaltenen Ergebnissen ist eine Beschreibung der Cluster als jeweils eine Art gerechtfertigt. Für das URT- Cluster mit dem Typstamm 2FIA<sup>T</sup> wird der Name *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. gewählt. Für das LRT- Cluster mit dem Typstamm 237IA<sup>T</sup> wird der Name *Mycoplasma struthionis* sp. nov. gewählt.



*Mycoplasma struthionis* sp. nov and *Mycoplasma nasistruthionis*  
sp. nov. from Ostrich (*Struthio camelus*) with respiratory tract  
disease.

Stefan Langer, Simone Muck, Martin Vronka, Joachim Spergser and Hans-Jürgen Busse  
Institute for Bacteriology, Mycology and Hygiene, University of Veterinary medicine, Veterinärplatz 1,  
A-1210 Vienna, Austria

---

Ten *Mycoplasma* sp. strains from the respiratory tract of ostriches (*Struthio camelus*) in Namibia, showing respiratory distress were isolated, applying conditions specific for mycoplasmas. Based on differences in their RAPD generated genomic fingerprints the isolates were grouped into two clusters. Six strains comprising one cluster were isolated from the lower respiratory tract (LRT- isolates) whereas remaining four strains were isolated from upper respiratory tract (URT- isolates). The representative if URT, 2FIA<sup>T</sup>, exhibited highest 16S rRNA gene sequence similarities with *Mycoplasma glycyphilum* 486<sup>T</sup> (95,0%), *Mycoplasma verecundum* GIH (94,6%) and *Mycoplasma felis* (94,5%). The representative of LRT, 237IA<sup>T</sup>, exhibited highest 16S rRNA gene sequence similarities with *Mycoplasma spumans* PG13<sup>T</sup> (97,3%), *Mycoplasma equirhinis* M432/72<sup>T</sup> (96,8%) and *Mycoplasma falconis* H/T1<sup>T</sup> (96,8%) and *Mycoplasma phocidae* CSL5364 (96,4%). DNA-DNA hybridisation showed that strain 237IA<sup>T</sup> is not related to *M. spumans* on the species level. Serological and 16-23S rDNA PCR-RFLP analyses the strains of cluster URT and LRT from their closest relatives. Certain lipids in the polar lipid profile were useful to differentiate 237IA<sup>T</sup> and 2FIA<sup>T</sup> from their closest relatives. The results showed that two clusters each represents a novel *Mycoplasma* sp. Hence the proposal of two novel *Mycoplasma* species is justified. As for strains of LRT-cluster we propose the name *Mycoplasma struthionis* sp. nov. with the type strain 237IA<sup>T</sup> (DSM pending). Strains of URT- cluster are proposed as *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. with the type strain 2FIA<sup>T</sup> (DSM pending).

---

Here we report on the characterisation of ten mycoplasma strains isolated from ostriches (*Struthio camelus*). So far mycoplasma have been isolated from ostriches (Botes et al.) but not validly described. Sampling took place at five different farms in Namibia. Mycoplasma were cultured from swabs used for probing the nasal cavity and minced lungs of respiratory distressed birds. Primary isolates were cultured by inoculating the swab or a portion of the minced lung in modified Hayflick medium at 37°C under an atmosphere of 7% CO<sub>2</sub> and 93% air.

The 16S rRNA gene was amplified using a Ready Mix™ Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma) using primers 27F and 1492r (Lane, 1991). The PCR products were sequenced by VBC-genomics (Vienna). Accession number of the 16S rRNA genes nucleotide sequences are 2FIA<sup>T</sup> = FM165077 and 237IA<sup>T</sup> = FM165076 respectively. Highest sequence identity identified *Mycoplasma glycyphilum* (95,0%), *Mycoplasma verecundum* (94,6%) *Mycoplasma felis* (94,5%) *Mycoplasma mustelae* (94,3%), *Mycoplasma edwardii* (94,2%), *Mycoplasma canis* (94,2%) and *Mycoplasma gallinaceum* (94,1%) as next relatives of 2FIA<sup>T</sup>. Further 16S rRNA gene identities were ≤ 93,7% as for *Mycoplasma bovirhinis*. *Mycoplasma spumans* (97,3%), *Mycoplasma equirhinis* (96,8%) and *Mycoplasma falconis* (96,8%), *Mycoplasma phocidae* (96,4%), *Mycoplasma gateae* (96,3%), *Mycoplasma hominis* (96,3%) and *Mycoplasma arginine* (96,1%) for 237IA<sup>T</sup>. Further 16S rRNA gene identities were ≤ 96,0% as for *Mycoplasma phocae*. Since 237IA<sup>T</sup> showed more than 97% similarity with *M. spumans*, DNA-DNA hybridisation was carried out with the two strains according to Ziemke et al. (1998), showing that 237IA<sup>T</sup> and *M. spumans* are different species (relative binding ratio 29,17%). Reassociation values of only 29% unambiguously demonstrate that 237IA<sup>T</sup> is a representative of a separate species.

Based on the 16S rRNA gene sequence identities to other mycoplasmas 237IA<sup>T</sup> could be placed in the *Mycoplasma hominis* cluster whereas 2FIA<sup>T</sup> could be placed in the *Mycoplasma synoviae* cluster (Pettersson et al. 2001). In the *M. synoviae* cluster the minimal 16S rRNA gene identity is 92,1% (between *M. gallinaceum* and *M. synoviae*). 2FIA<sup>T</sup> show slightly higher minimal identity to *M. synoviae* (92,4%). In the *M. hominis*



cluster the minimal 16Sr RNA gene identity is 94,8% (between *M. hominis* and *M. salivarium*). 237IA<sup>T</sup> show higher minimal identity to *M. salivarium* (95,2%)

The 16S-23S rRNA intergenic spacer sequence was sequenced, after amplification as described by Spargser and Rosengarten (2007) using Ready Mix<sup>TM</sup> Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma), using primer F2 and R2. Accession number of the partial 16S rRNA gene, 16S-23S rRNA intergenic spacer (ITS) and partial 23S rRNA gene are 2FIA<sup>T</sup> = FM196530 and 237IA<sup>T</sup> = FM196531 respectively. Highest sequence similarity to the 2FIA<sup>T</sup> ITS sequence was obtained with *Mycoplasma felis* (80,9%), *M. glycyphilum* (<68%) and *M. verecundum* (80,5% over 250Bp). Highest sequence similarity to the 237IA<sup>T</sup> ITS sequence was obtained with *M. falconis* (90,8%), *M. spumans* (88,7%), *Mycoplasma. phocidae* (88,5%) and *M. equirehinis* (84,6% over 190Bp). Whereas the 16Sr RNA gene sequence identities to the next relatives vary only marginal (0,5%) the variation in the ITS sequence is significantly higher (up to 12%). This is not surprising based on the variability in the ITS sequence since it is evolutionary not so stern conserved as the 16S rRNA gene. The results can be seen as a argument, supporting the 16Sr RNA gene sequence analysis, suggesting that 2FIA<sup>T</sup> and 237IA<sup>T</sup> respective are representatives of a new species.

*Mycoplasma* strains were cultured in an atmosphere of 7% CO<sub>2</sub> and 93% air at 37°C on modified Hayflick's agar (Rosengarten and Yogev, 1996). Triply clones of the isolates were subjected to characterisation as recommended by Tully (1983). After 48h, the typical fried-egg appearance of the colonies was easily visible on agar under a dissecting microscope (Nikon SMZ-U 1:10). Sharp margins indicated that the isolates were non-motile (International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*, 1995). Scanning electron micrograph results showed that both upper respiratory tract (URT) isolates and lower respiratory tract (LRT) isolates share a non helical morphology (Fig 1). LRT- isolates show an unusual trunk like structure formed by most of the cells, which are forming no aggregates in contrast to the cells of the URT- isolates. This result is consistent with a lower count of cfu on agar and a lower optical density in liquid medium but comparable amount of biomass when harvested for polar lipid analysis. Temperature tolerance was tested under

microaerobic conditions (Campy Gen<sup>TM</sup>, OXOID) at 6°C, 22°C, 28°C, 34°C, 37°C and 41°C. LRT- isolates and URT- isolates grow at 34°C and 37°C, URT- isolates also at 28°C.

For filtration studies cultures were diluted 1:1000 in medium after cultivation in modified Hayflick's medium and then passed through a membrane with a pore size of 0.8, 0.45 and 0.22µm (Roth) and incubated on plates. All isolates were filterable through the three different pore sizes.

Requirement for sterol was tested using two different methods. The inability to grow in the presence of digitonin (Tully 1983) and the cultivation of the isolates in serum lacking modified Hayflick's medium with 0.05% BSA, 0.05% Glucose, 10µg/ml palmitic acid and cholesterol (1µg/5µg/10µg or 20µg/ml). All isolates were sensitive to digitonin and did not grow in modified Hayflick's supplemented with cholesterol (≤20µg/ml) but lacking horse serum.

Acid production from glucose, lactose, maltose, saccharose, galactose, fructose, arabinose, sorbit, rhamnose, xylose, mannitol, trehalose, dulcitol, isositol, esculin and salicin were tested according to Aluotto et al. (1970) and Barber and Fabricant (1971). Hydrolysis of arginine, urea, gelatin and casein, reduction of methylene blue, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and potassium tellurite and phosphatase activity were tested as described by Aluotto et al. (1970). Production of films and spots were examined according to Freundt (1983). Haemadsorption was tested (Del Giudice and Pavia, 1964; Manchec and Taylor Robinson, 1968) with sheep erythrocytes and could be observed on colonies of all isolates.

For proper positive and negative controls, *Mycoplasma arthritidis* PG6<sup>T</sup> NCTC 10162<sup>T</sup>, *Mycoplasma bovirhinis* PG43<sup>T</sup> NCTC 10118<sup>T</sup>, *Mycoplasma gallinarum* Fowl/PG16<sup>T</sup> NCTC 10120 and *Ureaplasma diversum* Eva1 (isolate) were used.

URT- isolates were distinguishable from LRT- isolates based on their different traits shown in the Table 1 and in the species description below.

For comparison if the protein profiles a 4ml culture was harvested by centrifugation (13000 rpm, 10min), washed two times with saline (0.875% NaCl) and resuspended in sample buffer [1.5mM Tris/HCl, pH 6.8, 2.5% glycerine (v/v), 0.5% SDS (w/v) 0.1% bromphenolblue (w/v), 2.5% mercapthoethanol (v/v)] before incubated at 95°C for 5 min. The denaturised material has been separated on 10% polyacrylamid gels (Laemmli, 1970) and stained with coomassie blue or electroblotted onto nitrocellulose membranes by using a Peqlab horizontal blotting chamber (10V/190mA for 1 hour). For western blotting rabbit polyclonal antiserum, raised against 237IA<sup>T</sup> and 2FIA<sup>T</sup> respectively by immunizing two rabbits with 200µg of whole cell lysates plus Gerbo adjuvant on day 1, 22 and 43 of a 50 day protocol, was used. Detection was carried out using anti-rabbit IgG-HRP antibodies (Sigma) and 4-Chloro-1Naphthol as substrate. Uniform protein patterns of characterised URT- isolates and LRT- isolates respectively clearly distinguished the two groups from each other and from related species, as well (results not shown). Western blotting results also showed distinguish ability of URT- and LRT- isolates respectively from their next relatives (Fig. 2) *M. verecundum* and *M. glycyphilum* completely lacked high molecular weight proteins detectable with the serum raised against 2FIA<sup>T</sup>. *M. equirhinis* *M. falconis* and *M. spumans* lacked medium weight proteins and show different protein pattern in the high and low weight proteins detectable with the serum raised against 237IA<sup>T</sup> and therefore clearly distinguish from the LRT- isolates.

Colony immunoblots (Rosengarten and Yogev 1996) were performed using the antiserum against 237IA<sup>T</sup> and 2FIA<sup>T</sup>. Antibodies did not only bind the strain raised against, but also the respective closest related species. The antiserum against 237IA<sup>T</sup> showed a weak signal with *M. spumans*, and the 2FIA<sup>T</sup> antiserum showed a weak signal with *M. verecundum*.

Growth inhibition in the presence of antiserum was tested on modified Hayflick's medium agar, by applying antiserum in the middle of the agar after the Mycoplasmas were plated. Growth inhibition was observed with all LRT- isolates incubated in the presence of 237IA<sup>T</sup> antiserum but not with the related species (*M. glycyphilum* and *M. verecundum*). Comparable results were obtained with the URT- isolates, again a zone of inhibition was observed.

Amplification of the 16S-23S interspacer region and following digestion with Enzymes TaqI (LRT-isolates) and TaqI/VspI (URT- isolates) was carried out as described by Spargser and Rosengarten (2007) using Ready Mix<sup>TM</sup> Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma).

URT- isolates and LRT- isolates respectively clearly distinguished the two groups from each other and from related species as well (Fig3 and 4).

For genomic fingerprinting strains were subjected to RAPD-PCR using PureTaq<sup>TM</sup>Ready-To-Go<sup>TM</sup>PCR Beads (GE healthcare) and the two primers 5'CAA AGT TTG TTT GC-3' and 5'-AAG AGC CCG T-3' respectively, following the manufactures protocol (Fig. 5 and 6). With a different set of RAPD primers used it could be shown that the isolates are not clonally identical, while the same primers were not able to distinguish ten different *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type strains (unpublished results Stefan Langer). Homogenic fingerprints of URT- isolates clearly distinguishes them from *M. verecundum* and *M. glycyphilum*. Both relatives lack the three bands in the range between 1000 and 1500 bp. Although sharing one band with *M. spumans* the LRT- isolates were clearly distinguished from their relatives by the RAPD-Fingerprints.

Polar lipids were analysed according to Tindall et al. (1990) and Worliczek et al. (2007). The polar lipid profile (Fig 7a) of strain 2FIA<sup>T</sup> consisted of the major compounds diphosphatidylglycerol, 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acyl-glycero-3-phosphocholine, unknown phospholipid PL2, an unknown aminophospholipid AL1, moderate compounds of unknown phospholipid PL1, unknown glycolipid GL3 and phosphatidylglycerol, as well as the minor compounds unknown lipid L1 and L2, unknown glycolipid GL1 and GL2, phosphatidylethanolamin, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-phosphocholine and phosphocholine-6'- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-glycerol. This profile clearly distinguish from the profile of the related *M. glycyphilum* (results not shown) by the presence of unknown glycolipide GL1 and GL2, the unknown phospholipid PL1 and the unknown lipid L1 and contents of phosphatidylglycerol (Tab. 2).

The polar lipid profile of *M. verecundum* (results not shown) differed from both strains by the presence of several unknown glycolipids, aminophospholipids and aminolipids (Tab. 2).

The polar lipid profile of strain 237IA<sup>T</sup>, consisted of the major compounds 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acyl-glycero-3-phosphocholine, unknown phospholipid PL2 and the unknown aminophospholipid AL1, phosphatidylglycerol, the moderate compounds of unknown glycolipid GL3 and phosphatidylethanol, as well as the minor compounds unknown lipid L2 and L3, unknown glycolipid GL4, GL5, GL6 and GL7, phosphatidylethanolamin, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-phosphocholine and phosphocholine-6'- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-glycerol. *M. spumans* and strain 237IA<sup>T</sup> can be differentiated by the amount of unknown lipid 2. While the polar lipid profile of 237IA<sup>T</sup>, *M. spumans*, *M. equirhinis* and *M. falconis* was very similar, which is consistent with the 16S rRNA gene analysis, distinguishing was possible based on the amount of diphosphatidylglycerol (Tab. 3).

Our results suggest that the strains examined are representatives of two species for which we propose the names *Mycoplasma struthionis* sp. nov. and *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov..

Description of *Mycoplasma struthionis* sp. nov.

*Mycoplasma struthionis* sp. nov. (stru. thi. o'nis. L. gen. N. struthionis, of an ostrich because the strains have been isolated from the lung of ostriches)

Cells filterable through membrane with a pore size of 0.22µm filter. Typical fried egg colonies are visible on agar under dissecting microscope within 48h by incubation at 37°C in 7%CO<sub>2</sub> atmosphere. Non-helical and non-motile. Growth observed at 34-37°C. Chemo-organotroph. Serum or cholesterol is required for growth. No acid production was observed. It does not hydrolyse urea but arginine. Reduce potassium tellurite. Haemadsorption is observed with sheep erythrocytes. Major compounds of 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acyl-glycero-3-phosphocholine, unknown phospholipid PL2 and the unknown aminophospholipid AL1, phosphatidylglycerol. Moderate compounds of unknown glycolipid GL3 and phosphatidylethanol. Minor compounds unknown lipid L2 and L3, unknown glycolipid GL4, GL5, GL6 and GL7, phosphatidylethanolamin, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-phosphocholine and phosphocholine-6'-α-glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-glycerol.

Serologically distinct from other *Mycoplasma* species. 16S rRNA gene sequence unequivocally distinct from other *Mycoplasma* species. The type strain is 2371A<sup>T</sup>.

The strains were isolated from the lung of clinically ill ostriches.

Description of *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov.

*Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. (na. si. Stru. thi. o'nis. L. n. nasus –I, nose, L. n. struthio – onis, ostriche; N.L. gen. n. nasistruthionis, of the nose of an ostrich)

Cells filterable through membrane with a pore size of 0.22µm filter. Typical fried egg colonies on agar visible under dissection microscope within 48h by incubation at 37°C in 7%CO<sub>2</sub> atmosphere. Non-helical and non-motile. Growth is observed at 28-37°C. Chemo-organotroph. Serum or cholesterol is required for growth. It does not hydrolyse

urea or arginine. Acid is produced from glucose. Reduced methylenblue and potassium tellurite under anaerobic conditions. Haemadsorption is observed with sheep erythrocytes. Cells form aggregates. Major compounds diphosphatidylglycerol, 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acyl-glycero-3-phosphocholine, unknown phospholipid PL2 an unknown aminophospholipid AL1. Moderate compounds of unknown phospholipid PL1, unknown glycolipid GL3 and phosphatidylglycerol. Minor compounds unknown lipid L1 and L2, unknown glycolipid GL1 and GL2, phosphatidylethanolamin, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-phosphocholine and phosphocholine-6'- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-glycerol. It can be distinguished from its closest relatives based on the polar lipid profile.

Serologically distinct from other *Mycoplasma* species. 16S rRNA gene sequence unequivocally distinct from other *Mycoplasma* species. The type strain is 2FIA<sup>T</sup>.

The strains were isolated from the nasal cavity of clinically ill ostriches.

### **References:**

**Aloutto, B. B., Wittler, R. G., Williams, C.O. & Faber, J. E. (1970).** Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species. *Int. J Syst Bacteriol* **20**. 35-38.

**Barber, T. L., Fabricant, J. (1971).** Identification of Mycoplasmales: Characterisation Procedures. *Syst Appl Microbiol* **21**. 600-605.

**Botes, A., Peyrot, B. M., Olivier A. J., Burger, W. P., Bellstedt, D. U. (2005).** Identification of three novel mycoplasma species from ostriches in South Africa. *Veterinary Microbiol* **111**. 159-169.

**Del Giudice, R. A., Pavia, R. (1964).** Haemadsorption by *Mycoplasma pneumoniae* and its inhibition with sera from patients with atypical pneumonia. *Bacteriol Proc.* p. 71

**Freundt, E. A. (1983).** Film and spot production. *Methods Mycoplasmol* **1**. 373-374.

**Harasawa, R., Mizusawa, H., Nozama, T., Asada, K. and Ito, I. (1993).**

Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer regions. *Res. Microbiol.* **144**. 489–493

**International Committee on Systematics Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes* (1995).** Revised minimum standards for the description of new species of the class *Mollicutes* (Division *Tenericutes*). *Int J Syst Bacteriol* **45**. 605-612.

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**. 680-1132.

**Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (E. Stackebrandt, M. Goodfellow, eds.), *Chichester: John Wiley*. 115-175.

**Manchee, R. J., Taylor-Robinson, D. (1968).** Haemadsorption and Haemagglutination by Mycoplasmas. *J Gen Microbiol.* **50**. 465-478.

**Pearson, W. R., Lipman, D. J. (1988).** Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** (8). 2444-2448.

**Rosengarten, R., Yogev, D. (1996).** Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: Implication for species identification and strain standardization. *J. Clin Microbiol.* **34**. 149-158.

**Spergser, J. and Rosengarten, R. (2007).** Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S–23S rDNA PCR-RFLP. *Vet Med* **125**. 170-174.



**Tindall, B. J. (1990).** A comparative study of the lipid composition of *Halobacterium saccharovorum* from various sources. *Systematic and Applied Microbiology* **13**. 128-130.

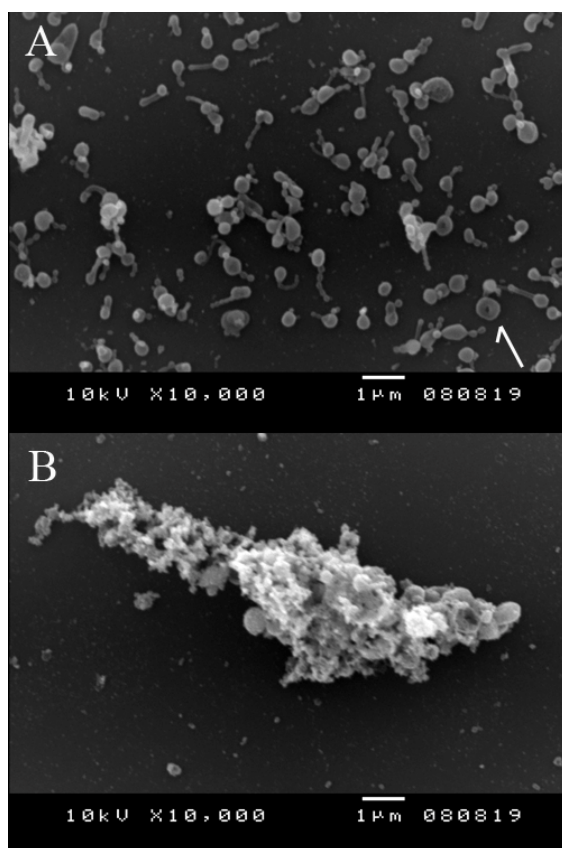
**Tully, J. G. (1983).** Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. *Methods Mycoplasma* **1**. 355-362.

**Worliczek, H. L., Kämpfer, P., Rosengarten, R., Tindall, B. J., Busse, H-J. (2007).** Polar Lipid and fatty acid profiles – Re-vitalizing old approaches as a modern tool for the classification of mycoplasmas. *Syst Appl Microbiol* **30**. 355-370.

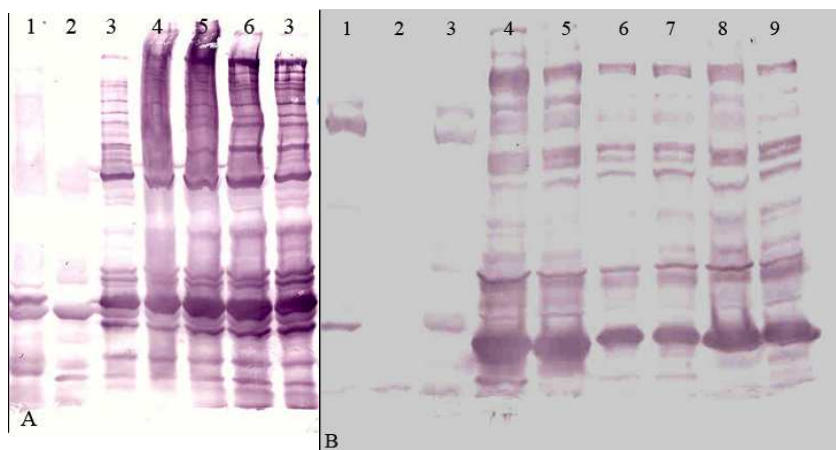
**Ziemke, F., Höfle, M. G., Lalucat, J., Rosselló-Mora, R. (1998).** Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov.. *Int J Syst Bacteriol* **48**. 179-186..

**Tab. 1: Traits distinguishing between LRT- isolates and URT- isolates.**

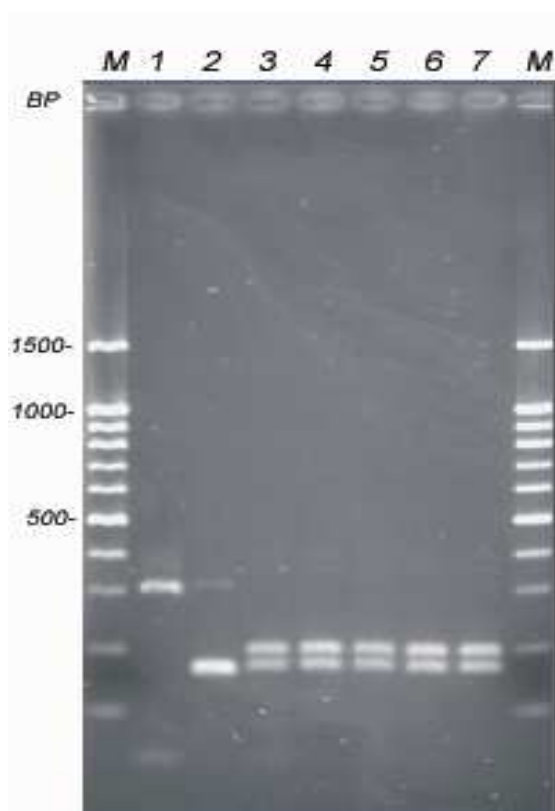
	LRT- isolates	URT- isolates
Growth at:		
28°C	-	+
34°C	+	+
37°C	+	+
Fermented glucose	-	+
Hydrolyse arginine	+	-
Reduced:		
Methylenblue	-	+
Potassium tellurit aerob.	+	+
Potassium tellurit anarob.	+	-
Phosphatase activity	+	-



**Fig. 1; Scanning electron micrograph of A) *Mycoplasma struthinos* sp. nov. 237IA<sup>T</sup> and B) *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. 2FIA<sup>T</sup>.**



**Fig. 2; A: Western Blot of URT- isolates. probed with polyclonal antiserum against strain 2FIA<sup>T</sup>. 1: *M. verecundum*, 2: *M. glycyphilum*, 3: strain 1FIA, 4: strain 1FIIA, 5: strain 2FIA<sup>T</sup>, 6: strain 2FIIA, 7: strain 1FIA. B: Western Blot of LRT- isolates probed with polyclonal antiserum against strain 237IA<sup>T</sup>. 1: *M. falconis*, 2: *M. equirhinis*, 3: *M. spumans*, 4: strain 237IA<sup>T</sup>, 5: strain 237IIA, 6: strain 238IA, 7: strain 238IIA, 8: strain VIA, 9: strain VIIA.**



**Fig. 3; 16S-23S rRNA gene PCR-RFLP (2% Agarose Gel) of URT- isolates. and the next two relatives. The DNA was digested with TaqI/VspI. 1: *M. glycyphilum*, 2: *M. verecundum*, 3 strain 1FIA, 4: strain 1FIIA, 5/6: strain 2FIA<sup>T</sup>, 7: strain 2FIIA; M indicates a 100Bp Ladder Marker (100Bp to 1000Bp) with an additional 1500Bp band (Bioron).**

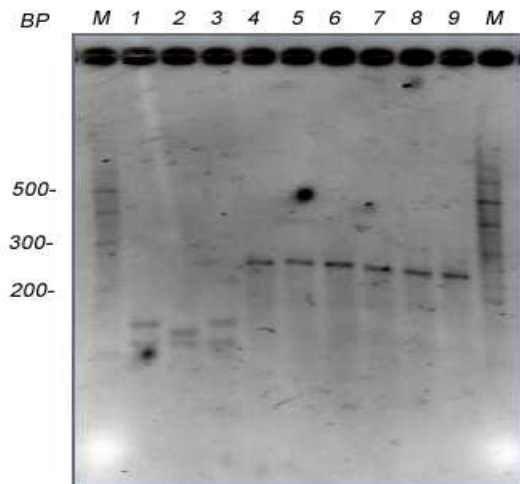


Fig. 4; 16S-23S rRNA gene PCR-RFLP (3% Agarose gel) of LRT- isolates and the next two relatives. The DNA was digested with TaqI. 1: *M. falconis*, 2: *M. equirhinis*, 3: *M. spumans*, 4: strain 237IA<sup>T</sup>, 5: strain 237IIA, 6: strain 238IA, 7: strain 238IIA, 8: strain VIA, 9: strain VIIA. M indicates a 100Bp Ladder Marker with an additional 1500Bp band (Bioron).

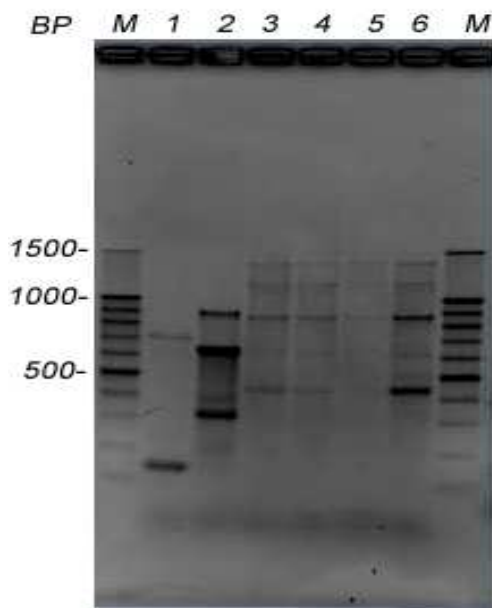
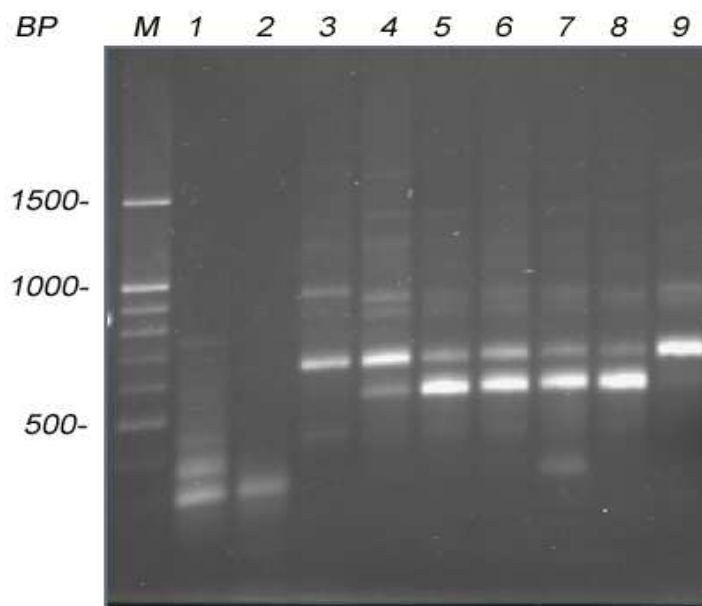
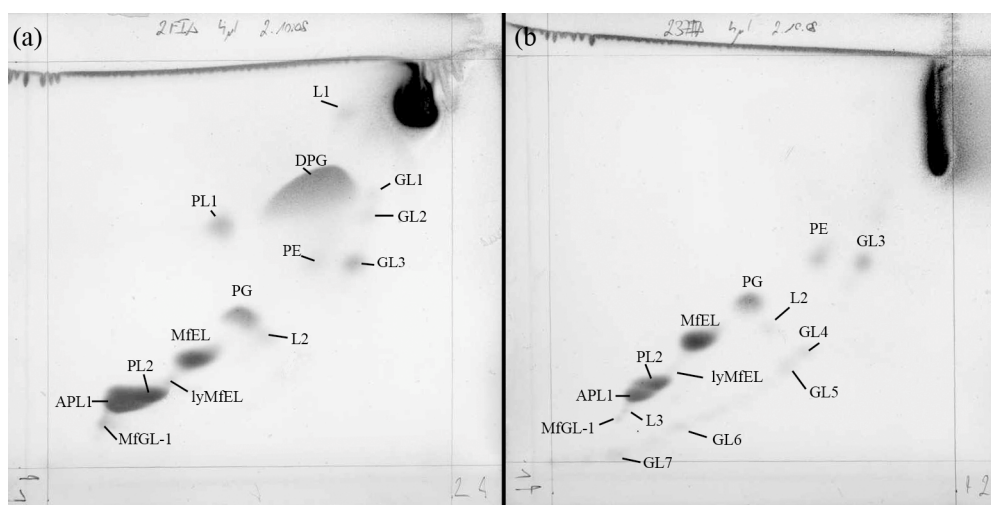


Fig. 5; RAPD-PCR (1,7% Agarose gel) of URT- isolates and the next two relatives. 1: *M. verecundum*, 2: *M. glycyphilum*, 3: strain 1FIA, 4: strain 1FIIA, 5: strain 2FIA<sup>T</sup>, 6: strain 2FIIA; M indicates a 100Bp Ladder Marker with an additional 1500Bp band (Bioron).



**Fig. 6; RAPD-PCR (1,7% Agarose gel) of LRT- isolates and the next three relatives. 1: *M. equirhinis*, 2: *M. spumans*, 3: *M. falconis*, 4: strain 237IA<sup>T</sup>, 5: strain 237IIA, Lane6: strain 238IA; 7: strain 238IIA, 8: strain VIA, 9: strain VIIA; M indicates a 100Bp Ladder Marker with a additional 1500Bp band (Bioron).**



**Fig. 7; Polar Lipid profiles of (a) URT- isolate 2FIA<sup>T</sup> (b) LRT- isolate 237IA<sup>T</sup>; after two dimensional TLC and detection with molybdatophosphoric acid. DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; MfEL, 1-O-alkyl/alkenyl-2-O-acyl-glycero-3-phosphocholine; lyMfEL, 1-O-alkyl/alkenyl-glycero-3-phosphocholine; MfGL-1, phosphocholine-6'- $\alpha$ -glucopyranosyl-(1'-3)-1, 2-diacyl-glycerol (=GGPL I); Lx, unknown lipid; PLx, unknown phospholipids, GLx, unknown glycolipid; APLx, unknown aminophospholipids.**

**Tab. 2: Distinguishing polare lipids of 2FIA<sup>T</sup> and the closest relatives. (-) not detected, (+) minor, (++) moderate and (+++) major compounds are indicated. Abbreviations see Fig7.**

Lipids	2FIA <sup>T</sup>	<i>M. glycyphilum</i>	<i>M. verecundum</i>
PL1	++	-	-
GL1	+	-	-
GL2	+	-	-
GL4-8	-	-	+
L1	+	-	+
L2	+	-	-
PE	+	+++	+
PG	+++	+	+
AL1	-	-	+
AL2	-	+	+
APL2	-	-	++
APL3	-	-	++

**Tab. 3: Distinguishing polare lipids of 237IA<sup>T</sup> and the closest relatives. (-) not detected, (+) minor, (++) moderate and (+++) major compounds are indicated. Abbreviations see Fig7.**

Lipid	237IA <sup>T</sup>	<i>M. spumans</i>	<i>M. equirhinis</i>	<i>M. falconis</i>
GL3	++	++	++	+
L2	+	++	++	+
L3	+	+	-	-
PE	++	++	++	+
PG	+++	+++	++	+
MfGL1	+	+	++	+

## 6 Curriculum vitae

Name: Stefan J. A. Langer  
Geburtsdatum: 26. August 1983  
Geburtsort: Wien  
Nationalität: Österreich

### **Ausbildung:**

- 1993 – 2001: BRGW VI Marchettigasse
- 2002 - 2009: Biologiestudium an der Universität Wien, Studienzweig Genetik/Mikrobiologie, mit Spezialisierung in molekularer Mikrobiologie. Im Rahmen der Wahlfächer Schwerpunkt in mikrobieller Ökologie sowie Arbeit mit Cyanobakterien
- 2007-2008: Diplomarbeit im Labor von H.-J. Busse, Veterinärmedizinische Universität Wien
- September 2008: Tutor bei den Übungen „molekulare Systematik“, Universität Wien
- Jänner-März 2009: Projektmitarbeiter im Labor von H.-J. Busse
- 2003–2006: Mitarbeiter in der Studienrichtungsvertretung Biologie (Erstsemestrigenbetreuung, Jounaldienste, Teilnahme an diversen Kommissionen wie z.B. Studienkommission und Institutskonferenz Genetik/Mikrobiologie)

### **Posterpräsentation:**

„Classification of *Mycoplasma* isolates from the Mucosa of Dogs:“ Langer S., Muck S., Busse H.J., Spargser J. 2008. Joint Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) and the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM) in Frankfurt, Germany. March 2008.

„*Mycoplasma canimucosale* sp. nov. isolated from the mucosa of dogs.“ Spargser J., Langer S., Muck S., Rosengarten R., Busse H. J. 2008. The 17<sup>th</sup> Congress of International Organization for Mycoplasmaology (IOM) in Tianjin, China, July 2008.

### **Publikation:**

„*Altererythrobacter indicus* sp.nov., isolated from wild rice (*Porteresia coartata* Takeota).“ N.Ramesh Kumar, Sudhar Nair, Stefan Langer, Hans-Jürgen Busse, Peter Kämpfer. Int J Syst Evol Microbiol (2008), 58, 839-844

„Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov. comb. nov. and *Afifella pfennigii* comb. nov., a new genus of photoheterotrophic *Alphaproteobacteria* and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gorkarnense*.“ Mercedes Uridiain, Arantxa López-López, Cristina Gonzalo, Hans-Jürgen Busse, Stefan Langer, Peter Kämpfer, Ramon Rosselló-Móra. Syst Appl Microbiol (2008), 31, 339-351

„*Novosphingobium acidiphilum* sp. nov., an acidophilic salt-sensitive bacterium isolated from the humic acid-rich Lake Grosse Fuchskuhle.“ Stefanie P. Glaeser, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Stefan Langer, and Jens Glaeser. Int J Syst Evol Microbiol (2009), 59, 323-330.



*“Ochrobactrum pituitosum* sp. nov., isolated from industrial environment.”

Birgit Huber, Holger C. Scholz, Peter Kämpfer, Enevold Falsen, Stefan Langer and  
Hans Jürgen Busse. Int. J Syst Evol Microbio (under revision)

## **Danksagungen:**

Vorab möchte ich mich bei Univ.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Busse für die Diplomarbeitsstelle bedanken und dafür das er immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und bei Univ.-Prof. Dr. Renate Rosengarten, welche es mir ermöglichte an ihrem Institut zu arbeiten. Ebenso bei Dr. Joachim Spargser für die Zusammenarbeit in der Klassifizierung von *Mycoplasma nasistruthionis* und *Mycoplasma struthionis*.

Ein weiteres Dankeschön an alle Mitarbeiter am Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien. Besonders möchte ich mich bei Birgit Huber bedanken, mir die Mysterien der PCR näher gebracht zu haben. Ebenso für ihre Geduld und Freundschaft. Weiters bei meinen Kollegen Simone Muck und Kathrin Macher.

Der größte Dank gilt aber meinem Vater Josef Langer und meiner Tante Anneliese Langer, welche immer für mich da waren und mich beim Erreichen meiner Ziele immer unterstützt und gefördert haben. Euch und eurer Unterstützung habe ich das Meiste zu verdanken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen Freunden Nathalie, Kathi sowie Christine bedanken, die mich bei vielen gemeinsamen Kaffee immer wieder aufgemuntert haben.

„Vielleicht gibt es schönere Zeiten; aber diese ist die unsere.“  
Jean Paul Sartre

Ebenso bei Anna, Daniel und all die anderen die mich während meines Studiums begleitet haben.

Natürlich auch bei Katharina die im Endspurt viel „ertragen“ musste, aber nicht müde wurde mich zu motivieren.